

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/05489

17.08.00

10-049419

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2000年 3月13日

Recd 05 OCT 2000

出願番号

Application Number:

特願2000-069223

出願人

Applicant (s):

資酒造株式会社

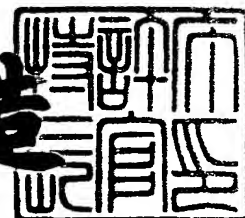
4

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3076044

【書類名】 特許願

【整理番号】 T-1495

【提出日】 平成12年 3月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/00
A23L 1/03

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 富永 隆生

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 山下 周作

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 水谷 滋利

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中
央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063223

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン産生調節を要する疾患、免疫賦活を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤。

【請求項 2】 フコイダンが藻類由来、又は棘皮動物由来である請求項 1 記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 3】 サイトカインがインターロイキン類、又はインターフェロン類である請求項 1 又は 2 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 4】 インターフェロン類がインターフェロン- γ である請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 5】 インターロイキン類がインターロイキン-1 2 である請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 6】 免疫賦活を要する疾患が細胞障害性 T 細胞の増強を要する疾患である請求項 1 又は 2 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 7】 アレルギー性疾患が I g E 産生抑制を要する疾患である請求項 1 又は 2 記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 8】 経口用治療剤又は経口用予防剤である請求項 1 又は 2 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 9】 フコイダン及び／又はその分解物を含有、添加及び／又は希釈してなるサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、免疫賦活用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、又は抗アレルギー用食品、飲料又は飼料。

【請求項 1 0】 フコイダンが藻類由来、又は棘皮動物由来である請求項 9 記載の食品、飲料又は飼料。

【請求項 1 1】 サイトカインがインターロイキン類、又はインターフェロン類である請求項 9 又は 1 0 に記載のサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料。

【請求項 1 2】 インターフェロン類がインターフェロン- γ である請求項 9 ～ 1 1 いずれか 1 項に記載のサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料。

【請求項 1 3】 インターロイキン類がインターロイキン-1 2 である請求項 9 ～ 1 1 いずれか 1 項に記載のサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料。

【請求項 1 4】 細胞障害性 T 細胞増強用食品、飲料又は飼料である請求項 9 又は 1 0 に記載の免疫賦活用食品、飲料又は飼料。

【請求項 1 5】 I g E 産生抑制用食品、飲料又は飼料である請求項 9 又は 1 0 に記載の抗アレルギー用食品、飲料又は飼料。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は水生生物由来の生理活性物質の医薬、食品又は飲料としての用途に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

水生生物由来の生理活性物質としては、フコイダンが知られている。このフコイダンは藻類、棘皮動物等に含まれている硫酸化フコース含有多糖であり、硫酸化フコースを構成糖として含むものである。

【 0 0 0 3 】

フコイダンの生理作用としてはがん増殖抑制活性、がん転移抑制活性、抗凝血活性、抗ウイルス活性等が知られており、医薬品としての用途開発が期待されている。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明はフコイダンの新たな生理作用を見出すことにあり、その目的はフコイダンのサイトカイン産生調節作用等を利用した医薬、食品又は飲料を提供することにある。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明を概説すれば、本発明の第 1 の発明は、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン産生調節を要する疾患、免疫賦活を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー疾患の治療剤又は予防剤に関する。

本発明の第 2 の発明は、フコイダン及び／又はその分解物を含有、添加及び／又は希釈してなるサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、免疫賦活用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、又は抗アレルギー用食品、飲料又は飼料に関する。

本発明により、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン産生調節剤、免疫賦活剤、細胞障害性 T 細胞増強剤、一酸化窒素産生誘導剤、抗アレルギー剤、又は I g E 産生抑制剤が提供される。

本発明は、フコイダン及び／又はその分解物のサイトカイン産生調節剤、免疫賦活剤、細胞障害性 T 細胞増強剤、一酸化窒素産生誘導剤、抗アレルギー剤、又は I g E 産生抑制剤の製造における使用を提供する。

本発明は、フコイダン及び／又はその分解物のサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、免疫賦活用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、又は抗アレルギー用食品、飲料又は飼料の製造における使用を提供する。

本発明により、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として使用することを特徴とするサイトカイン産生調節方法、免疫賦活方法、細胞障害性 T 細胞増強方法、一酸化窒素産生誘導方法、アレルギー抑制方法、又は I g E 産生抑制方法が提供される。

【 0 0 0 6 】

本発明において使用するフコイダンに特に限定はないが、藻類由来フコイダン又は棘皮動物由来フコイダンが例示される。

またフコイダンの分解物としては、例えばフコイダンの酸分解物、フコイダンの酵素分解物が使用できる。

本発明に使用するフコイダン、フコイダンの分解物、例えばフコイダンの酸分解物、フコイダンの酵素分解物は特に限定はなく、サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、例えば細胞障害性T細胞増強作用、一酸化窒素産生作用、又は抗アレルギー作用、例えばIgE産生抑制作用等を示せばよく、サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、例えば細胞障害性T細胞増強作用、一酸化窒素産生作用、抗アレルギー作用、例えばIgE産生抑制作用を指標に調製することができる。

サイトカイン類とは、フコイダン又はその分解物が産生調節作用を示すサイトカイン類であり、インターロイキン類、例えばインターロイキン-12、インターフェロン類、例えばインターフェロン- γ が例示される。

免疫賦活作用とは、フコイダン又はその分解物が生体の免疫能の活性化を示す免疫賦活作用であり、細胞障害性T細胞の増強作用が例示される。

抗アレルギー作用とは、フコイダン又はその分解物がアレルギー抑制作用を示す抗アレルギー作用であり、IgE産生抑制作用が例示される。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明に使用するフコイダンとは硫酸化フコースを構成成分として含むもので、サイトカイン産生調節作用、例えば抗原提示細胞（APC）とT細胞との抗原伝達反応時におけるインターフェロン- γ 産生調節作用、インターロイキン-12産生調節作用、免疫賦活作用、例えば細胞障害性T細胞増強作用、一酸化窒素産生誘導作用、又は抗アレルギー作用、例えばIgE産生抑制作用を有すれば良く、特に限定はないが、例えばガゴメ昆布、トロロ昆布、ヒバマタ、オキナワモズク、ワカメ、クロメ、アラメ、カジメ、ジャイアントケルプ、レッソニア ニグレセンス、アスコフィラム ノドッサム等の昆布目、ながもつも目、ひばまた目等の海藻は特に本発明の使用に好適なフコイダンを多く含んでおり、原料として好適である。また、棘皮動物、例えばナマコ、ウニ、ヒトデ等由来のフコイダンを使用してもよい。

【0008】

これらのフコイダンの調製はそれぞれ公知の方法で調製すれば良く、精製物又

は当該フコイダン等を本発明に使用することができる。

【 0 0 0 9 】

例えばガゴメ昆布からフコイダンを調製し、該フコイダンをグルクロン酸含有フコイダン（U-フコイダンと称す）とグルクロン酸非含有フコイダン（F-フコイダンと称す）を分離することができ、本発明の有効成分としてそれぞれのフコイダンを使用することが出来る。また、ガゴメ昆布から硫酸化フコガラクトン（G-フコイダンと称す）を調製し、使用することができる。

【 0 0 1 0 】

U-フコイダン及びF-フコイダンはガゴメ昆布からフコイダンを調製後、陰イオン交換樹脂、界面活性剤等を用いて分離される。ガゴメ昆布由来のU-フコイダン及びF-フコイダンの存在比は約 1 : 2 であり、U-フコイダンはフコース、マンノース、ガラクトース、グルクロン酸等を含み硫酸含量は約 2 0 %、F-フコイダンはフコースとガラクトースを含み、硫酸含量は約 5 0 %、分子量は両物質共に約 2 0 万を中心に分布している（第 1 8 回糖質シンポジウム要旨集、第 1 5 9 頁、1 9 9 6 年）。

【 0 0 1 1 】

例えばガゴメ昆布から調製したフコイダン溶液を D E A E - セルロファイン A - 8 0 0 カラムにアプライ後、N a C l 含有緩衝液にて濃度勾配法により溶出させることにより、U-フコイダンとF-フコイダンに分離することができる。図 1 にその 1 例を示す。すなわち図 1 はU-フコイダンとF-フコイダンの分離を示す図であり、図中前ピークがU-フコイダン、後ピークがF-フコイダンである。

【 0 0 1 2 】

また、ガゴメ昆布由来フコイダンをアルテロモナス *s p.* S N - 1 0 0 9 (F E R M B P - 5 7 4 7) が産生するF-フコイダン特異的分解酵素、及びフラボバクテリウム *s p.* S A - 0 0 8 2 (F E R M B P - 5 4 0 2) が産生するU-フコイダン特異的分解酵素で分解し、分解物を除去することにより、前出G-フコイダンを精製することができる。

【 0 0 1 3 】

また例えばヒバマタ由来フコイダン、オキナワモズク由来フコイダン、ワカメ由来フコイダン、ワカメ メカブ由来フコイダンもそれぞれ公知の方法でフコイダンを調製し、本発明に使用することができる。

フコイダンを含有するナマコとしては、例えば特開平4-91027号公報に記載のナマコがあり、当該公報記載の方法にてナマコよりフコイダンを調製することができる。

【0014】

また本発明に使用するサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有するフコイダンの分解物は、酵素学的方法、化学的方法、物理的方法等の公知の方法にて、目的のサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有する分解物を選択し、使用することができる。

本発明で使用するフコイダンの分解物の調製方法としては酸分解法があり、当該フコイダンを酸分解することにより、サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有する分解物を調製することができる。

【0015】

本発明で使用するフコイダンの酸分解条件は、サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有する分解物（以下、本発明の分解物と称す）が生成する条件であれば、特に限定はない。

例えばフコイダンを酸に溶解またはけん濁し、反応させることにより、本発明の分解物が生成する。また、反応時に加熱することにより、本発明の分解物の生成に必要な時間が短縮される。

フコイダンを溶解またはけん濁する酸の種類は、特に限定するものではないが、塩酸、硫酸、硝酸等の無機塩、クエン酸、ギ酸、酢酸、乳酸、アスコルビン酸等の有機酸、また陽イオン交換樹脂、陽イオン交換繊維、陽イオン交換膜等の固体酸が使用可能である。

【0016】

酸の濃度も特に限定はないが、0.0001～5規定、好ましくは0.01～

1 規定程度の濃度で使用可能である。また、反応温度も特に限定は無いが 0 ～ 2 0 0 ℃、好ましくは 2 0 ～ 1 3 0 ℃ に設定すれば良い。

また、反応時間も特に限定するものではないが、数秒～数日に設定すれば良い。酸の種類と濃度、反応温度及び反応時間は本発明の分解物の生成量、分解物の重合度により適宜選択すれば良い。例えば、本発明の分解物の製造に際しては、クエン酸、乳酸、リンゴ酸等の有機酸を使用し、酸の濃度は数 1 0 m M ～ 数 M、加熱温度は 5 0 ～ 1 1 0 ℃、好適には 7 0 ～ 9 5 ℃、加熱時間は数分～2 4 時間の範囲から適宜選択することにより、本発明の分解物を調製することができる。フコイダンの酸分解物としてはガゴメ昆布由来フコイダンの酸分解物が例示され、当該分解物はサイトカイン産生調節作用、特に A P C と T 細胞との抗原伝達反応時におけるインターフェロン- γ 産生調節作用、免疫賦活作用、特に細胞障害性 T 細胞増強作用、一酸化窒素産生誘導作用、及び抗アレルギー作用の強い新生理機能を有する食物繊維として使用することができる。

【 0 0 1 7 】

本発明の分解物はサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を指標として分画することができ、例えば酸分解物をゲルろ過法、分子量分画膜による分画法等により分子量分画することができる。

ゲルろ過法の例としては、セルロファイン G C L - 3 0 0 を使用し、例えば分子量 2 5 0 0 0 超、分子量 2 5 0 0 0 ～ 1 0 0 0 0 超、分子量 1 0 0 0 0 ～ 5 0 0 0 超、分子量 5 0 0 0 以下等の任意の分子量画分を調製でき、セルロファイン G C L - 2 5 を用い、例えば分子量 5 0 0 0 以下の画分を分子量 5 0 0 0 ～ 3 0 0 0 超、分子量 3 0 0 0 ～ 2 0 0 0 超、分子量 2 0 0 0 ～ 1 0 0 0 超、分子量 1 0 0 0 ～ 5 0 0 超、分子量 5 0 0 以下等の任意の分子量画分に調製することができる。

【 0 0 1 8 】

また、限外ろ過膜を用いて工業的に分子量分画を行うことができ、例えばダイセル社製 F E 1 0 - F U S O 3 8 2 を用いることにより分子量 3 0 0 0 0 以下の画分を、同 F E - F U S - T 6 5 3 を使用することによって分子量 6 0 0 0 以下

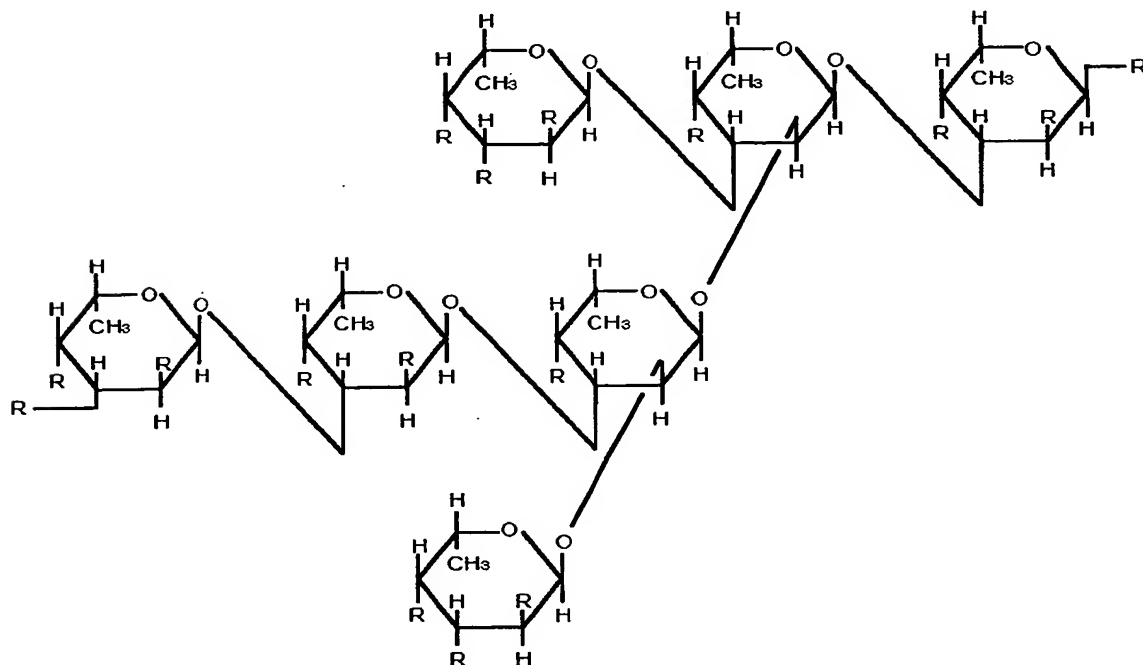
の画分を調製することができる。更にナノフィルター膜を用いることにより分子量 500 以下の画分を得ることもでき、これらのゲルろ過法、分子量分画法を組み合わせるにより、任意の分子量画分を調製することができる。

【0019】

本発明で利用できるサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有するフコイダンの分解物としては、下記式（化1）～（化4）で表される化合物が例示され、これらの化合物はWO97/26896公報、PCT/J P99/00606号明細書、PCT/J P00/00965号明細書に記載の方法で調製することができる。また、本発明のフコイダンの分解物としては、WO97/26896公報、PCT/J P99/00606号明細書、PCT/J P00/00965号明細書に記載のフコイダンの分解物も包含される。なお、式（化1）で表される化合物の繰返し構造を有するフコイダン、及びオリゴ糖は本発明に好適に使用することができる。

【0020】

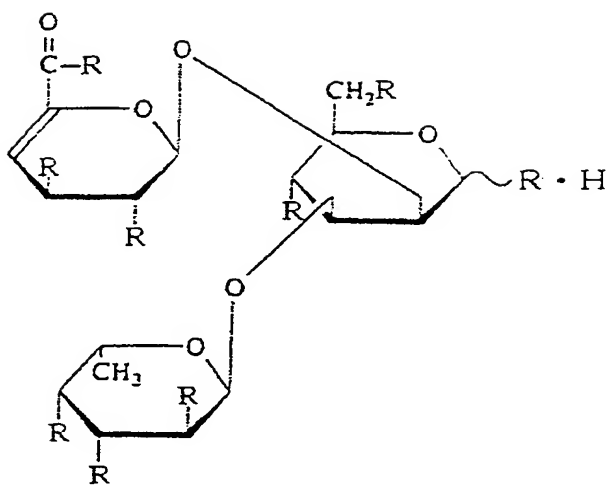
【化1】



（式中、RはOH又はOSO₃である。）

【0021】

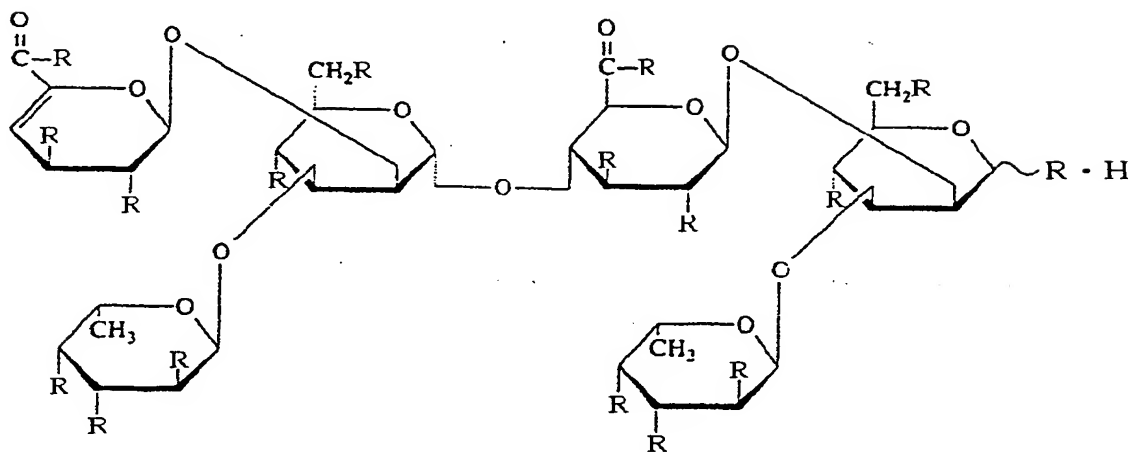
【化2】



(式中、RはOH又はOSO₃である。)

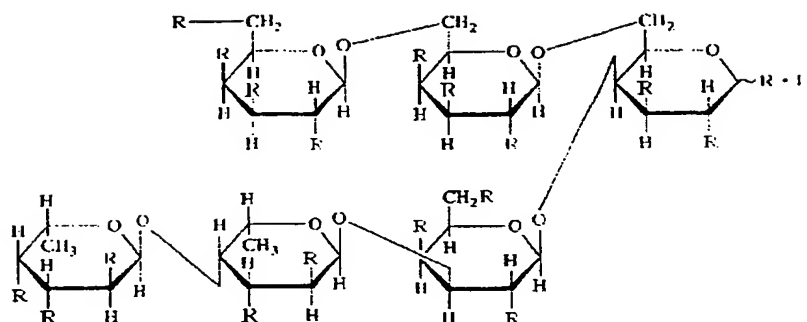
【0022】

【化3】



(式中、RはOH又はOSO₃である。)

【化4】



(式中、RはOH又はOSO₃である。)

【0023】

なお式(化1)で表される化合物の例としては後述の式(化5)で表される化合物がある。

【0024】

式(化1)で表される化合物は、例えば前出Fーフコイダンを、アルテロモナス *s p.* SN-1009 (FERM BP-5747) が産生するエンド型硫酸化多糖分解酵素(Fーフコイダン特異的分解酵素)で処理し、その分解物より精製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式(化1)で表される化合物の多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

【0025】

式(化3)で表される化合物は、例えば前出Uーフコイダンを、フラボバクテリウム *s p.* SA-0082 (FERM BP-5402) が産生するエンド硫酸化多糖分解酵素(Uーフコイダン特異的分解酵素)で処理し、その分解物より精製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式(化3)で表される化合物を基本骨格とする、その多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

【0026】

式(化4)で表される化合物は、例えばフラボバクテリウム *sp.* SA-0082 (FERM BP-5402) より得られるG-フコイダンの特異的に分解するエンド型硫酸化多糖分解酵素(G-フコイダン特異的分解酵素)をG-フコイダンに作用させることにより、当該G-フコイダンの分解物を調製し、当該分解物中より、目的に応じ分解物を精製することができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式(化4)で表される化合物を基本骨格とする、その多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

【0027】

本発明における産生調節を要するサイトカインとは特に限定はないが、例えばインターロイキン(IL)-1~18、インターフェロン(IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、リンボトキシン、腫瘍壊死因子(TNF)、幹細胞因子(SCF)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球・コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)等が例示される。

【0028】

これらのサイトカインは遅延型過敏反応や標的細胞障害をはじめ、種々の細胞性免疫反応の発現や調節に関与するもの(IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 等)、抗体産生機構において、その調節機能に関与するもの(IL-2、IL-4、IL-5、IL-6等)、腫瘍細胞に対して直接増殖抑制作用や破壊作用を示すもの(TNF- α 、TNF- β 、IFN等)、骨髓における造血幹細胞や前駆細胞の増殖・分化を促進するもの(IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、GM-CSF、G-CSF、M-CSF等)炎症反応に関与するもの(IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 、TNF- β 、IFN等)、アレルギー反応に関与するもの(IL-3、IL-4、IL-5等)、NK細胞活性を増強するもの(IL-12)等があり、サイトカインの産生を調節することにより、がん等の細胞性免疫反応の発現や調節を要する疾患、自己免疫症のような抗体産生の調節を要する疾患、細胞の分化を要する疾患、炎症の抑制を要する疾患の治療又は予防が可能となる

【0029】

本発明で使用するフコイダン及びその分解物はサイトカイン産生調節能を有し、これらの化合物を有効成分としてサイトカインの産生調節を要する上記疾患の治療剤又は予防剤を製造することができる。

本発明で使用するフコイダン及びその分解物は免疫賦活作用、例えば細胞障害性T細胞増強作用を有し、これらの化合物を有効成分とし、細胞障害性T細胞増強を要する疾患、例えばウイルス性疾患、がん性疾患等の治療剤又は予防剤を製造することができる。

本発明で使用するフコイダン及びその分解物は一酸化窒素産生誘導作用を有し、これらの化合物を有効成分として、一酸化窒素産生誘導を要する疾患、例えば血管平滑筋の弛緩、栓球、顆粒球及び単球の血管壁への付着の抑制、分泌性平滑筋の細胞の増殖阻止等を要する動脈硬化症の治療剤又は予防剤を製造することができる。

本発明で使用するフコイダン及びその分解物は、抗アレルギー作用、例えばIgE産生抑制作用を有し、これらの化合物を有効成分として、アレルギー疾患、例えばIgE産生により媒介されるか悪化する症状、例えばIgEが起因となるアレルギー疾患、例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、じん麻疹、アナフィラキシーショック等治療剤又は予防剤を製造することができる。本発明の抗アレルギー剤は抗原感作後のIgE産生抑制作用を有すること、経口投与で抗原感作後のIgE産生抑制作用を有する点において極めて有用な抗アレルギー剤である。

【0030】

本発明の治療剤及び予防剤は、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば良い。当該製剤の製造は一般的には、フコイダン及び／又はその分解物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また

これを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

【 0 0 3 1 】

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

【 0 0 3 2 】

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である、フコイダン及び／又はその分解物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製することができる。

【 0 0 3 3 】

本発明の治療剤又は予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与することができる。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

【 0 0 3 4 】

本発明の治療剤又は予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるフコイダン及び／又はその分解物の量が成人1日当たり0.1～2000mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。またフコイダン及び／又はその分解物をサイトカイン産生調節用飲食品又は飼料、免疫賦活用飲食

品又は飼料、一酸化窒素産生誘導用飲食品又は飼料、抗アレルギー用飲食品又は飼料の原料として用いても良い。

【0035】

また本発明により、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有するIFN- γ 産生調節剤、IL-12産生調節剤、細胞障害性T細胞増強剤、一酸化窒素産生誘導剤、IgE産生抑制剤が提供される。これらの薬剤は上記治療剤又は予防剤に準じ製造され、その投与を要する疾患に適用することができる。

【0036】

リンパ球からのIFN- γ の産生誘導には、ConA等のマイトジェンにおけるT細胞の直接刺激による誘導、および抗原感作時における抗原提示細胞(APC)とT細胞との細胞間相互作用による誘導が知られている。前者はマイトジェンのT細胞レセプターへの直接結合による誘導であり、後者はAPCとT細胞との各レセプターの刺激、及びそれによりAPCから産生されたIL-12による産生誘導である。IL-12産生誘導に関与するレセプターの反応としてT細胞レセプター(TCR)/主要組織適合性複合体(MHC)の他、副刺激としてT細胞側のCD40LとAPC側のCD40、及びT細胞側のCD28とAPC側のB7の各反応が知られている。

従来、Laminaria japonica由来のフコイダンが、正常マウス由来の脾臓リンパ球からのIFN- γ 産生を誘導し、NK細胞の活性化を増強する(中国海洋薬物雑誌、1995第3期、9~13)との報告があるが、これは静止期にあるナイーブT細胞への直接刺激による誘導である。

一方、今回、本発明者らが確認したガゴメ昆布由来フコイダン、及びその画分のIFN- γ の産生誘導作用に関しては、実施例に示すように、リンパ球の直接刺激、またはアロ抗原刺激時における誘導作用は認められず、感作リンパ球の抗原刺激下でのみIFN- γ 産生を増強させた。さらにこのときIL-12の誘導も認められた。この抗原提示反応時におけるIFN- γ 誘導作用は抗IL-12抗体により産生されたIL-12を中和したときに約50%が抑制され、抗CD40及び抗CD28抗体でこれらのレセプターの反応を阻害したときには完全に抑制された。このことより、ガゴメ昆布由来フコイダン、及びその画分のIFN

— γ の産生誘導の作用機序に関して、抗原提示反応時においてAPCにはたらい
てIL-12産生を増強させたことによるもの、及びAPCとT細胞との相互作用
により活性化された状態にあるT細胞にはたらいて誘導した可能性が推測され
る。

静止期のT細胞に対する直接誘導作用を見ている上記報告に記載のフコイダン
と本発明で使用するガゴメ昆布由来フコイダンは異なり、その結果は、全く異なる
作用を示すものである。

【0037】

また抗原提示細胞の一つであるマクロファージの細胞株を用いた系で、フコイ
ダン及びその分解物は、一酸化窒素産生を誘導し、その誘導により免疫賦活効果
があることを示しているが、この系においても、フコイダン及びその分解物によ
るIFN- γ の産生誘導は見られず、本発明に使用するフコイダン及びその分解
物には、IFN- γ を直接誘導する活性はなく、一酸化窒素の産生増強とIL-
12の産生増強が平行であると考えられることから、本発明によるフコイ
ダンおよびその分解物によるIFN- γ の産生増強は、静止期T細胞の直接刺激
による誘導ではなく、抗原提示反応時においてAPCにはたらいてIL-12産
生を増強させたことによるもの、及びAPCとT細胞との相互作用により活性化
された状態にあるT細胞にはたらいて誘導した可能性が推測される。この点から
も本発明に使用されるフコイダンおよびその分解物は直接誘導作用を見ている上
記報告とは、全く異なる作用を示すものである。

なおIFN- γ はT細胞(Th1)のT細胞レセプターが抗原提示細胞(APC)等により刺激されたとき産生され、さらにAPCから産生されるIL-12
によって産生が増強される。IFN- γ はウイルス、真菌感染、および癌疾患等
において細胞障害性T細胞、NK細胞、マクロファージ等の細胞性免疫を活性化
させ、生体防御能の増強に働く。

一方、IFN- γ は喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎等に代表されるアレルギー
疾患の発生の原因とされているTh2細胞の活性化を抑制することが知られて
いる。Th2細胞は免疫グロブリンE抗体(IgE)の産生を誘導する。産生さ
れたIgEはマスト細胞の細胞膜上のレセプターに結合し、マスト細胞からのケ

ミカルメディエーターの放出を惹起する。この炎症性のメディエーターが直接の原因となりアレルギー症状が発症する。

本発明の抗アレルギー剤は抗原感作後の経口投与において、IgE産生を抑制し、発症後の喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎等に代表されるアレルギー疾患の症状改善に極めて有用である。

【0038】

次にサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、又は抗アレルギー作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は、そのサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用により、フコイダン又はその分解物に感受性を示すサイトカイン産生調節を要する疾患、免疫賦活を要する疾患、一酸化窒素産生誘導を要する疾患、アレルギー疾患の症状改善、予防に極めて有用である。

【0039】

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料にサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、及び一酸化窒素産生誘導作用を有するフコイダン及び／又はその分解物が有効成分として含有、添加及び／又は希釈されていれば良い。

【0040】

本発明の食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆等）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実

飲料、野菜飲料、ミックス飲料等）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類等）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュール等）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料等）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりん等）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥又は濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープ等）、冷凍食品（すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテル等）、固形食品、液体食品（スープ等）、香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

【 0 0 4 1 】

本発明の食品又は飲料としては、サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物が含有、添加及び／又は希釈されており、その生理機能を発現するための必要量が含有されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。なお、サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理作用を有するフコイダン及びその分解物は、当該生理作用と食物繊維機能を合わせ持つ健康食品素材として、食品又は飲料の製造素材として極めて有用である。

【 0 0 4 2 】

本発明により、サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物を生物に投与することを特徴とする生物の飼育方法が提供される。

当該生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物を含有、添加及び／又

は希釈してなる生物用飼料が提供される。

【 0 0 4 3 】

また当該生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物を含有することを特徴とする生物飼育用剤が提供される。

【 0 0 4 4 】

これらの発明において、生物とは例えば養殖動物、ペット動物等であり、養殖動物としては家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類又は貝類が例示される。

飼料としては体調改善用飼料が例示される。

生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。

これらの発明において、当該生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物は、生物の飼育効率、例えば生存率、肥育率、産卵率、産仔率、離乳率等を向上させる効果を有する。

当該生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物は通常、対象生物の体重 1 k g、1 日当たり 0 . 0 1 ~ 2 0 0 0 m g 投与され、人工配合飼料の原料中に添加混合させるか、人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料に添加混合させることができる。

当該生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物の対象生物用飼料中の含有量は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、0 . 0 0 1 ~ 1 5 w / w % の割合が適当である。

人工配合飼料としては、魚粉、カゼイン、イカミールなどの動物性原料、大豆粕、小麦粉、デンプン、飼料用酵母などの植物性原料、タラ肝油、イカ肝油、などの動物性油脂、大豆油、菜種油等の植物性油脂、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸、抗酸化剤等を原料とする人工配合飼料が挙げられる。また魚肉ミンチ等の魚類用飼料が挙げられる。

又、機能性オリゴ糖、例えばフラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖等、食物繊維、例えばポリデキストロース、難消化性デキストリン、 β -1, 3-グルカン等、プロポリス、糖アルコール、例えばマルチトール、パラニチット、エリスリトール等、E P A、 γ -リノレン酸、ヘム鉄、クロレラ、スピルリナ、ホワイトベリーエキス、難う触性素材、例えばポリフェノール等の機能性食品素材を本

発明の飼料の原料として使用しても良い。なお本発明において飼料としては、飼料添加剤、飼料用栄養補助食も包含される。

【0045】

本発明の飼料の製造方法に特に限定は無く、製造された飼料中にサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物の有効量が含有、添加及び／又は希釈されていればよい。

また当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物をプール、水槽、保持タンク又は飼育領域の水、海水等に直接、添加し、対象生物を浸漬することにより、投与することもできる。この浸漬方法は対象生物の飼料摂取量が低下したときに特に有効である。

水又は海水中のフコイダン及び／又はその分解物の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、0.00001～1 w/w%の割合が適当である。

また当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を含有する飲料を飼育用飲料として対象生物に摂取させても良い。

飲料中の当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、0.0001～1 w/w%の割合が適当である。

当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を有効成分とする飼育用剤、例えば浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤はそれ自体公知の方法で作製すれば良い。

【0046】

本発明が適用できる生物としては限定は無いが、養殖動物としては、馬、牛、豚、羊、山羊、らくだ、ラマ等の家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等の実験動物、鶏、アヒル、七面鳥、駝鳥等の家禽、マダイ、イシダイ、ヒラメ、カレイ、ブリ、ハマチ、ヒラマサ、マグロ、シマアジ、アユ、サケ・マス類、トラフグ、ウナギ、ドジョウ、ナマズ等の魚類、クルマエビ、ブラックタイガー、タイショウエビ、ガザミ等の甲殻類等、アワビ、サザエ、ホタテ貝、カキ等の貝

類、ペット動物としてはイヌ、ネコ等が挙げられ、陸上・水中動物に広く適用できる。

【0047】

サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物を含有する飼料を摂取すること、又は当該フコイダン及び／又はその分解物の含有液に対象生物を浸漬することにより、家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類、貝類、ペット動物等の体調、健康、生体の恒常性、新陳代謝等が改善が顕著であり、本発明は生物の老化防止に極めて有用である。

【0048】

サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理活性を有するフコイダン及び／又はその分解物は化粧料の有効成分として有用であり、本発明により本発明で使用するフコイダン及び／又はその分解物を有効成分とするサイトカイン産生調節作用化粧料、免疫賦活作用化粧料、一酸化窒素産生誘導作用化粧料、抗アレルギー用化粧料等が提供される。

これらの化粧品に含有されるフコイダン及び／又はその分解物の配合量は通常0.0001～20重量%、好ましくは0.001～5重量%である。

本発明の化粧料は経皮的、経口的に有効であり本発明により経皮投与、経口投与で有効な化粧料が提供される。特に抗アレルギー用化粧料はその抗アトピー作用により、アトピー性皮膚炎の治療、予防に有用な化粧料である。

【0049】

本発明の化粧料は常法に従って製造することができ、サイトカイン産生調節作用化粧料、免疫賦活作用化粧料、一酸化窒素産生誘導作用化粧料、抗アレルギー用化粧料、例えばローション類、乳液類、クリーム類、パック類、浴用剤、洗顔剤、浴用洗剤、毛髪剤、育毛剤又は洗髪剤を製造することができる。

【0050】

本発明に使用するサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有するフコイダン及び／又はその分解物はラット

に経口投与において 1 g / k g を経口単回投与しても死亡例は認められない。

【 0 0 5 1 】

【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。なお、実施例における % は重量 % を意味する。

【 0 0 5 2 】

参考例 1

(1) ガゴメ昆布を充分乾燥後、乾燥物 2 0 k g を自由粉碎機 (奈良機械製作所製) により粉碎した。

水道水 9 0 0 リットルに塩化カルシウム二水和物 (日本曹達社製) 7 . 3 k g を溶解し、次にガゴメ昆布粉碎物 2 0 k g を混合した。液温 1 2 ℃ から液温 9 0 ℃ となるまで水蒸気吹込みにより 4 0 分間昇温させ、次いでかくはん下 9 0 ~ 9 5 ℃ に 1 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 1 1 0 0 リットルを得た。

次いで固液分離装置 (ウエストファリアセパレーター社製 C N A 型) を用い、冷却物の固液分離を行い、約 9 0 0 リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液 3 6 0 リットルをダイセル社製 F E 1 0 - F C - F U S 0 3 8 2 (分画分子量 3 万) を用い、2 0 リットルまで濃縮した。次いで水道水を 2 0 リットル加え、また 2 0 リットルまで濃縮するという操作を 5 回行い、脱塩処理を行い、ガゴメ昆布由来の抽出液 2 5 リットルを調製した。

該溶液 1 リットルを凍結乾燥し、ガゴメ昆布由来フコイダン乾燥物 1 3 g を得た。

【 0 0 5 3 】

(2) 参考例 1 - (1) 記載のフコイダン乾燥物 7 g を、5 0 m M の塩化ナトリウムと 1 0 % のエタノールを含む 2 0 m M のイミダゾール緩衝液 (p H 8 . 0) 7 0 0 m l に溶解し、遠心分離により不溶物を除去した。D E A E - セルロフアイン A - 8 0 0 カラム (φ 1 1 . 4 c m × 4 8 c m) を同緩衝液にて平衡化し、遠心分離上清をアプライ後、同緩衝液で洗い、塩化ナトリウムの 5 0 m M から 1 . 9 5 M の濃度勾配により溶出させた (1 フラクション : 2 5 0 m l) 。フェ

ノール硫酸法及びカルバゾール硫酸法にて、総糖量及びウロン酸含量を求め、溶出順にフラクション43～49、フラクション50～55、フラクション56～67の画分を得た。次に、これらの画分を電気透析により脱塩後凍結乾燥し、フラクション43～49より1画分(340mg)、フラクション50～55より11画分(870mg)、フラクション56～67より111画分(2.64g)をそれぞれ調製した。

【0054】

図1にガゴメ昆布由来フコイダンのDEAE-セルロフラインA-800カラム溶出パターンを示す。図1において縦軸はカルバゾール硫酸法での530nmの吸光度(図中黒丸)、フェノール硫酸法での480nmの吸光度(図中白丸)、及び電導度(mS/cm:図中白四角)、横軸はフラクション番号を示す。

【0055】

参考例2

(1) アルテロモナス *s.p.* SN-1009 (FERM BP-5747) を、グルコース 0.25%、ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.05%を含む人工海水(ジャマリンラボラトリー社製) pH 8.2 からなる培地 600ml を分注して殺菌した(120℃、20分間) 2リットルの三角フラスコに接種し、25℃で26時間培養して種培養液とした。ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.02%、下記参考例2-(2)に記載の硫酸化多糖 0.2%、及び消泡剤(信越化学工業社製KM70) 0.01%を含む人工海水 pH 8.0 からなる培地 20リットルを30リットル容のジャーファメンターに入れて120℃、20分間殺菌した。冷却後、上記の種培養液 600ml を接種し、24℃で24時間、毎分10リットルの通気量と毎分250回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。得られた培養上清を、排除分子量1万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により濃縮後85%飽和硫酸塩析し、生じた沈殿を遠心分離により集め、10分の1濃度の人工海水を含む20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH 8.2)に対して充分透析し、600mlの硫酸化多糖に選択的に作用するエンド型硫酸化多糖分解酵素液を調製した。

【0056】

(2) 乾燥したガゴメ昆布 2 Kg を直径 1 mm のスクリーンを装着させたカッターミル (増幸産業社製) により粉碎し、得られた昆布のチップを 20 リットルの 80 % エタノール中に懸濁し、25℃で3時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、95℃に加温した 40 リットルの 50 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5 に懸濁し、時々かくはんしながら 95℃で2時間処理し、硫酸化多糖を抽出した。

抽出液中の懸濁物を、ろ過し、ろ液を調製した後、ろ過残渣を 3.5 リットルの 100 mM 塩化ナトリウムにより洗浄し、更にろ液を得た。

ろ液を合わせた後、30℃まで温度を下げ、3000 U のアルギン酸リアーゼ K (ナガセ生化学工業社製) を添加後、エタノールを 4 リットル加え 25℃で 24 時間かくはんした。次に遠心分離を行い、得られた上清を排除分子量 10 万のホロファイバーを備えた限外ろ過器により 4 リットルに濃縮し、更に、10%のエタノールを含む 100 mM の塩化ナトリウムにより、着色性物質がろ過されなくなるまで限外ろ過を続けた。

非ろ過液中に生じた沈殿は遠心分離により除去し、この上清を 5℃まで温度を下げ、0.5 N 塩酸により pH を 2.0 とした後、生じたタンパク質等の沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を速やかに 1 N 水酸化ナトリウムにより pH を 8.0 とした。

次に、排除分子量 10 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過器により限外ろ過を行い、20 mM 塩化ナトリウム pH 8.0 により完全に溶媒置換後、再度 pH を 8.0 とし、遠心分離後、凍結乾燥を行い、約 95 g の硫酸化多糖を調製した。

【0057】

(3) 乾燥したガゴメ昆布 2 Kg を直径 1 mm のスクリーンを装着させたカッターミルにより粉碎し、得られた昆布のチップを 20 リットルの 80 % エタノール中に懸濁し、25℃で3時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、30 ml の上記参考例 2-(1) で調製したエンド型硫酸化多糖分解酵素、10%のエタノール、100 mM の塩化ナトリウム、50 mM の

塩化カルシウム、及び50 mMのイミダゾールを含む20リットルの緩衝液（pH 8.2）に懸濁し、25℃で48時間かくはんした。この懸濁液を網目の直径32 μ mのステンレス金網でろ過し、残渣を50 mMの塩化カルシウムを含む10%のエタノールで洗浄した。更にその残渣を10リットルの50 mM塩化カルシウムを含む10%のエタノール中に懸濁し、3時間かくはん後、ステンレス金網でろ過、洗浄した。更にその残渣を同条件で懸濁後、16時間かくはんし、直径32 μ mのステンレス金網でろ過、洗浄した。

こうして得られたろ液及び洗浄液を集め、排除分子量3000のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により限外ろ過し、ろ過液と非ろ過液に分離した。

このろ過液をロータリーエバポレーターで約3リットルに濃縮後、遠心分離して上清を得た。得られた上清を排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、この溶液に0.1 Mとなるように酢酸カルシウムを添加し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清をあらかじめ50 mMの酢酸カルシウムにより平衡化させたDEAE-セルロファイン（樹脂量4リットル）にかけ、50 mMの酢酸カルシウム及び50 mMの塩化ナトリウムで充分洗浄後、50 mM～800 mMの塩化ナトリウムのグラジエントにより溶出させた。この時の分取量は1本当り500 mlで行った。分取した画分をセルロースアセテート膜電気泳動法【アナリティカル バイオケミストリー（Analytical Biochemistry）、第37巻、第197～202頁（1970）】により分析したところ塩化ナトリウム濃度が約0.4 Mで溶出される硫酸化糖（フラクションナンバー63付近）が均一であった。

そこで、まずフラクションナンバー63の液を150 mlに濃縮後、濃度が4 Mとなるように塩化ナトリウムを添加し、あらかじめ4 Mの塩化ナトリウムにより平衡化したPhenyl-セルロファイン（樹脂量200 ml）にかけ、4 Mの塩化ナトリウムにより充分洗浄した。非吸着性の硫酸化糖画分を集め、排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、脱塩液505 mlを得た。

。

得られた脱塩液のうち40 mlを10%のエタノールを含む0.2 Mの塩化ナトリウムによって平衡化させたセルロファインGCL-90のカラム（4.1 c

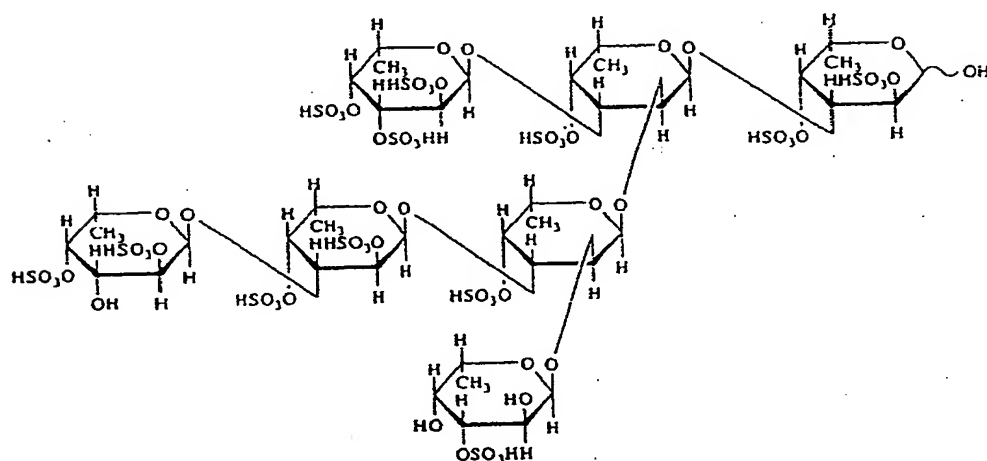
m×87cm) にかけて、ゲルろ過を行った。分取は1フラクション当り9.2mlで行った。

全フラクションに対して総糖量の分析をフェノール硫酸法〔アナリティカルケミストリー (Analytical Chemistry)、第28巻、第350頁(1956)〕により行った。

この結果、硫酸化糖は1つのピークを形成したので、そのピークの中央部分、フラクションナンバー63～70を集め、排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩後、凍結乾燥し、112mgの下記式(化5)で表される化合物の乾燥品を得た。

【0058】

【化5】



【0059】

参考例3

(1) 乾燥ガゴメ昆布2Kgを穴径1mmのスクリーンを装着したカッターミル(増幸産業社製)により破碎し、20リットルの80%エタノール中で25℃、3時間攪拌後ろ過、洗浄した。得られた残渣を50mMの塩化カルシウム、100mMの塩化ナトリウム、10%のエタノール、及び参考例2-(1)で調製したアルテロモナス sp. SN-1009 (FERM BP-5747) エンド型硫酸化多糖分解酵素(F-フコイダン特異的分解酵素)を1U含む20リットルの30mMイミダゾール緩衝液(pH8.2)に懸濁し、25℃で2日攪

拌し、次いで孔径 $32\ \mu\text{m}$ のステンレス金網でろ過し、洗浄した。得られた残渣を $100\ \text{mM}$ の塩化ナトリウム、 10% のエタノール、及び $4\ \text{g}$ のアルギン酸リアーゼ（ナガセ生化学工業製）を含む 40 リットルのリン酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH } 6.6$ ）に懸濁し、 25°C 、 4 日攪拌後、遠心分離し上清を得た。得られた上清中に含まれるアルギン酸の低分子化物を除去するため、排除分子量 10 万のホロファイバーを装着した限外ろ過機により 2 リットルに濃縮後、 10% のエタノールを含む $100\ \text{mM}$ の塩化ナトリウムで溶液交換した。この溶液に等量の $400\ \text{mM}$ 酢酸カルシウムを添加攪拌後、遠心分離し、得られた上清を氷冷しながら、 $1\ \text{N}$ の塩酸で $\text{pH } 2$ とした。生じた沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を $1\ \text{N}$ の水酸化ナトリウムにより $\text{pH } 8.0$ とした。この溶液を限外ろ過により 1 リットルに濃縮後、 $100\ \text{mM}$ の塩化ナトリウムで溶液交換した。この時生じた沈殿は遠心分離により除去した。得られた上清中の疎水性物質を除去するため、上清に $1\ \text{M}$ となるように塩化ナトリウムを加えて、 $1\ \text{M}$ の塩化ナトリウムで平衡化した 3 リットルのフェニルセルロファインカラム（生化学工業製）にかけ、素通り画分を集めた。この画分を限外ろ過機により濃縮後、 $20\ \text{mM}$ の塩化ナトリウムで溶液交換し、凍結乾燥した。凍結乾燥物の重量は $29.3\ \text{g}$ であった。

【0060】

(2) 上記の凍結乾燥物 $15\ \text{g}$ を $400\ \text{mM}$ の塩化ナトリウム及び WO 97/26896 公報記載のフラボバクテリウム *s.p.* SA-0082 (FERM BP-5402) を培養し、該培養物から得られたエンド型硫酸化多糖分解酵素（U-フコイダン特異的分解酵素）を $9\ \text{U}$ 含む 1.5 リットルの $50\ \text{mM}$ トリス塩酸緩衝液に溶解し、 25°C で 6 日反応後、エバポレーターで約 $300\ \text{ml}$ に濃縮した。濃縮液を排除分子量 3500 の透析チューブに入れて徹底的に透析し、透析チューブ内に残った液を、 $50\ \text{mM}$ の塩化ナトリウムで平衡化した 4 リットルの DEAE-セルロファイン A-800 にかけ、 $50\ \text{mM}$ 塩化ナトリウムで充分洗浄後、 $50\sim 650\ \text{mM}$ の塩化ナトリウムの濃度勾配による溶出を行った。更に同カラムを $650\ \text{mM}$ の塩化ナトリウムで充分溶出させた。溶出画分のうち $650\ \text{mM}$ の塩化ナトリウムで溶出した画分を硫酸化フコガラクトタン画分とし

て集め、排除分子量10万の限外ろ過機により濃縮後、10 mMの塩化ナトリウムで溶液を置換し、凍結乾燥して硫酸化フコガラクトンの凍結乾燥物を0.85 g得た。得られた硫酸化フコガラクトン（G-フコイダン）は、構成糖としてガラクトースとフコースを含有し、そのモル比は、約2：1であった。

【0061】

参考例4

市販のワカメ メカブの乾燥物1 Kgを穴の径が1 mmのスクリーンを装着させたカッターミルにより破碎後、10リットルの80%エタノール中に懸濁し、3時間攪拌後、ろ紙によりろ過し、残渣を得た。残渣を50 mMの塩化ナトリウムを含む40 mMのリン酸緩衝液（pH 6.5）20リットルに懸濁し95℃で2時間処理した。処理液を37℃まで冷却後、10%となるようにエタノールを添加し、市販のアルギン酸リアーゼK（ナガセ生化学工業社製）を12000 U添加後、室温で24時間攪拌した。得られた処理液を遠心分離し、その上清を排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により2リットルに濃縮後、生じた沈殿を遠心分離により除去した。得られた上清を5℃に冷却後0.5 Nの塩酸を添加してpHを2.0とした後30分間攪拌し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。上清のpHを0.5 Nの水酸化ナトリウムにより8.0とし、限外ろ過により溶液を20 mMの塩化ナトリウムに置換した。溶液のpHを8.0に調整後、遠心分離して得られた上清を凍結乾燥し、90.5 gのワカメ メカブ由来フコイダンを得た。

【0062】

参考例5

粉碎したヒバマタ（*Fucus vesiculosus*）の乾燥物1 Kgを、10リットルの80%エタノール中に懸濁し、3時間攪拌後、ろ紙によりろ過し、残渣を得た。残渣を100 mMの塩化ナトリウムを含む30 mMのリン酸緩衝液（pH 6.0）30リットルに懸濁し95℃で2時間処理した。処理液を37℃まで冷却後、100 gの活性炭を添加し30分間攪拌した。市販のアルギン酸リアーゼKを3000 U添加後、10%となるようにエタノールを添加し室温で24時間攪拌した。得られた処理液を遠心分離し、その上清を排除分子量10万のホロファイバ

ーを装着させた限外ろ過機により2リットルに濃縮後、生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清に抽出液を加えながら限外ろ過し、色素を除去した。得られた非ろ過液を5℃に冷却後0.5Nの塩酸を添加してpHを2.0とした後30分間攪拌し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。上清のpHを0.5Nの水酸化ナトリウムにより8.0とし、限外ろ過により溶液を20mMの塩化ナトリウムに置換した。溶液のpHを8.0に調整後、遠心分離して得られた上清を凍結乾燥し、71gのヒバマタ由来フコイダンを得た。

【0063】

参考例6

参考例1-(1)記載の方法で調製したガゴメ昆布由来フコイダン2gを100mlの水に溶解し、そのpHをクエン酸にてpH3に調整後、100℃で3時間処理し、当該フコイダンの酸分解物を調製した。この酸分解物をセルロファインGCL-300、又はセルロファインGCL-25によるゲルろ過で分子量分画し、分子画25000超(A画分)、25000~10000超(B画分)、10000~5000超(C画分)、5000~2000超(D画分)、2000~500超(E画分)、500以下(F画分)に分画した。更にこれらの画分及び酸分解物をそれぞれ脱塩後凍結乾燥を行い、酸分解物の各分画物及び酸分解物を調製した。

【0064】

参考例7

マナマコを5kg解体し、内臓を除去し、体壁を集めた。体壁湿重量200g当り500mlのアセトンを加え、ホモジナイザーで処理後ろ過し、残渣をこれ以上着色物質がなくなるまでアセトンで洗浄した。この残渣を吸引乾燥し、140gの乾燥物を得た。この乾燥物に0.4Mの食塩水2.8リットルを加え、100℃で1時間処理後、ろ過し、残渣を0.4Mの食塩水で充分洗浄し、抽出液3.7リットルを得た。この抽出液に5%のセチルピリジニウムクロリドを沈殿が生じなくなるまで加え、生じた沈殿を遠心分離で集めた。この沈殿を0.4Mの食塩水に懸濁後再度遠心分離し、得られた沈殿に1リットルの4M食塩水を添加し、ホモジナイザーで処理後、かくはんしながら4リットルのエタノールを添

加し、1時間かくはん後、ろ過し、沈殿を得た。この沈殿に対して、80%エタノールに懸濁後ろ過という工程を上清の260nmの吸光度が0になるまで繰り返した。得られた沈殿を2リットルの2M食塩水に懸濁し、不溶物を遠心分離により除去した。上清を排除分子量3万の膜を備えた限外ろ過装置により限外ろ過し、完全に脱塩後、凍結乾燥し3.7gのナマコ由来フコイダンを得た。

【0065】

参考例8

市販の塩蔵オキナワモズク625gを4375mlの30mMりん酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)に懸濁し、ホモジナイザーにより8000回転/分、5分処理後、95℃、1時間処理し、遠心分離により上清を得た。得られた上清に10gの活性炭を添加後30分間攪拌し、遠心分離により上清を得た。得られた上清を排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により2リットルに濃縮後、20mMの塩化ナトリウムで溶液置換し、凍結乾燥して10.9gのオキナワモズク由来のフコイダン画分の乾燥物を得た。

【0066】

実施例1

(1) 10%ウシ胎児血清(ギブコ社製)含有、フェノールレッド不含、2mM L-グルタミン(ライフテックオリエンタル社製、25030-149)含有ダルベッコ改良イーグル培地(バイオウィタカー社製、12-917F)にRAW264.7細胞(ATCC TIB 71)を 6×10^5 /mlになるように懸濁し、48穴マイクロタイタープレートのウェルに500 μ lずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37℃で12時間培養した。各ウェルに試料水溶液を添加して更に12時間培養した後、NOが培地中で酸化されることによって生ずるNO₂⁻濃度の測定を行った。試料として、参考例1-(2)記載のガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、及びIII画分、参考例2-(3)記載の式(化5)で表される化合物(以下、7-12Sと称す)は、最終濃度が、1、10、100 μ g/mlになるように添加した。なお、ポジティブコントロールとしてリポポリサッカライド(LPS、シグマ社製)を最終濃度が、1 μ g/mlになるように添加した。

上記培養後、 $100\mu\text{l}$ の培地に $100\mu\text{l}$ の4%グリース試薬（シグマ社製、G4410）を加え、室温で15分間放置した後、 540nm における吸光度を測定した。上記培地に溶解した既知の濃度の NaNO_2 で作製した検量線から培地中の NO_2^- 濃度を計算した。測定はすべて3連で行った。

この結果、7-12S、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、及びIII画分はどれもNO産生誘導を促進し、免疫賦活作用があることが明らかになった。その結果を図2～5に示す。すなわち、図2は7-12S、図3はI画分、図4はII画分、図5はIII画分を添加して培養した時の培地中の NO_2^- 濃度を示す図である。また図6は対照のLPSを添加して培養した時の培地中の NO_2^- 濃度を示す図である。図2～6において横軸は培養条件を、縦軸は NO_2^- 濃度（ μM ）を示す。

これらの結果より、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、及び7-12Sには、NO産生誘導作用、及び該作用を介した免疫賦活効果があることが明らかになった。

なお、各参考例に記載のフコイダン及びその分解物も同様のNO産生誘導作用を示した。

また NO_2^- 濃度を測定した培養液と同じ培養液中のIFN- γ 量をELISAキット（Genzyme社）を用いて測定した。しかし、この系においてはガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12S、及び各参考例に記載のフコイダンにIFN- γ の産生増強は見られなかった。

【0067】

実施例2

（1）非刺激リンパ球からのIFN- γ 誘導作用

ICRマウス（雌、7週齢、体重約25g）は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。マウスより脾臓を摘出し、細かく粉碎して10%牛胎児血清（ハイクローン社）を含んだRPMI-1640培地（ギブコ社）に懸濁して単細胞液を得た。接着性細胞をプラスチックシャーレに接着させて除き、非接着性細胞を脾臓リンパ球として用いた。脾臓リンパ球は10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地に懸濁して $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ に調整

し、 $200\mu\text{l}$ /ウェルで96穴マイクロタイタープレートに播種した。対照群以外の各ウェルに各濃度の参考例に記載の各フコイダン、ガゴメ昆布フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12Sまたは $2\mu\text{g}$ のコンカナバリンA (ConA; ナカライテスク社) を添加し 37°C 、5%炭酸ガス培養器で2日間または4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- γ 量をELISAキット (Genzyme社) を用いて測定した。

その結果、参考例に記載の各フコイダン、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12Sは $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の用量において非刺激リンパ球からのIFN- γ 誘導作用は認められなかった。一方、ConAを添加した細胞では強いIFN- γ の誘導が認められた。

【0068】

(2) アロ抗原刺激下におけるIFN- γ 誘導作用

BALB/cマウス (雌、6週齢、体重約 20g)、C57BL/6マウス (雌、6週齢、体重約 20g) は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。H-2のハプロタイプの異なったマウス (BALB/c; H-2d、C57BL/6; H-2b) より脾臓を摘出し、上記の方法により脾臓リンパ球を得た。各細胞浮遊液の細胞濃度を $2\times 10^6\text{cells}/\text{ml}$ に調整し、 $100\mu\text{l}$ づつを96穴マイクロタイタープレートに播種した。対照群以外の各ウェルに各濃度の参考例に記載の各フコイダン、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12Sまたは $2\mu\text{g}$ のConAを添加し 37°C 、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- γ 量をELISAキットを用いて測定した。

【0069】

その結果、参考例に記載の各フコイダン、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12Sは $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の用量においてアロ抗原刺激状態のリンパ球に対するIFN- γ 誘導作用は認められなかった。一方、ConAを添加した細胞では強いIFN- γ の誘導が認められた。

【0070】

(3) 感作リンパ球の抗原刺激下におけるIFN- γ 誘導作用

C57BL/6マウス（雌、6週齢、体重約20g）は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。マウスの腹腔内に 1×10^6 cellsのMeth-Aマウス肉腫細胞を接種して免疫した。腫瘍接種14日後に脾臓を摘出し、上記の方法により脾臓リンパ球を得た。細胞浮遊液の細胞濃度を 2×10^6 cells/mlに調整し、100 μ lづつを96穴マイクロタイタープレートに播種した。刺激細胞の調製のため、RPMI-1640培地に懸濁して 2×10^6 cells/mlに調整したMeth-A肉腫細胞にマイトマイシンC（協和発酵）を50 μ g/mlの濃度で添加して37℃で30分間処理し、2回洗浄後、10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地に懸濁して 2×10^6 cells/mlに調整した。調製した刺激細胞を100 μ l/ウェルで脾臓リンパ球を加えたプレートの各ウェルに重層し、37℃、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。ガゴメ昆布由来フコイダンは1～100 μ g/mlとなるよう、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12Sは各10～500 μ g/mlとなるように添加し培養した。また対照にはCon Aを2 μ g添加し培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- γ 量をELISAキットを用いて測定した。同培養上清においてIL-12量をELISAキット(ENDOGEN社)を用いて測定した。

【0071】

その結果を図7、図8に示す。すなわち図7はフコイダン及びその分解物のIFN- γ 産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸はIFN- γ 産生量（pg/ml）、横軸は各試料、及び添加量（ μ g/ml）を示す。

また図8はフコイダン及びその分解物IL-12産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸はIFN- γ 産生量（pg/ml）、横軸は各試料、及び添加量（ μ g/ml）を示す。

図7、図8に示すように、感作リンパ球の抗原刺激下において、ガゴメ昆布由来フコイダンは1～100 μ g/mlの用量において、I画分、II画分、III画分、及び7-12Sは10～500 μ g/mlの用量において用量依存的なIFN- γ 、及びIL-12産性の増強作用を示した。また各参考例に記載のフコイダンおよびその分解物も同様の作用を示した。

【0072】

実施例 3

C57BL/6マウス（雌、7週齢、体重約20g）は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。LCMV（Lymphocytic choriomeningitis virus、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス）由来でマウスの主要組織適合性抗原class-Iに結合する配列表の配列番号1に記載のペプチド〔以下LCMVと称す：ヨーロッパジャーナル オブ イムノロジー（European Journal of Immunology）、第28巻、第10号、第3301～3311頁（1998年）〕50 μ moleとヘルパーペプチドとしてHBV（Hepatitis B virus、B型肝炎ウイルス）由来でマウスの主要組織適合性抗原class I 1に結合する配列表の配列番号2に記載のペプチド〔以下HBVと称す：ジャーナル オブ ヴィロロジー（Jornal of Virology）、第69巻、第5号、第2776～2785頁（1995年）〕100 μ moleを完全フロイントアジュバントと混ぜ、エマルジョンを調製し、マウスの尾の付け根の皮下に免疫した。免疫の10日後にマウスより脾臓を摘出し、細かく粉碎して10%牛胎児血清（ハイクローン社）を含んだRPMI-1640培地（バイオウィッタカー社）に懸濁して単細胞液を得た。脾臓リンパ球は10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地に懸濁して 3×10^6 cells/mlに調整し、T25フラスコ（イワキ社）に10ml加え、LCMVペプチドを100 ng/mlとなるように添加した。フラスコは同じものを2つずつ用意し、一方には培地を、他方にはガゴメ昆布由来フコイタンを10 μ g/mlとなるように添加し、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

培養開始より10日後に細胞を回収し、所定の濃度になるように10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地で希釈し、96穴丸底マイクロプレートに100 μ lずつ分注した。

【0073】

細胞傷害性T細胞の細胞傷害活性は、⁵¹CrでラベルしたEL4胸腺腫瘍細胞をターゲットとし、培養上清中に遊離してくる γ 線量を測定した。すなわち、EL4にChromium-51 Radionuclide（ニューイングランドニュークリア社）1850 kBqを加え37℃で一時間培養し、遠心操作にてRPMI-1640培地で

3回洗浄した。10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地に懸濁して 1×10^5 cells/mlに調整し、同じ96穴マイクロプレートに播種した。LCMVペプチドも $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように同時に添加した。37℃、5%CO₂存在下で5時間培養し、上清100 μl を採取し、 γ シンチレーションカウンターにて遊離した γ 線量を測定した。細胞傷害活性は次のように算出した。

【0074】

【数1】

$$\text{細胞傷害活性}(\%) = \{ (\text{実験値} - \text{対照値}) / (\text{総放射活性値} - \text{対照値}) \} \times 100$$

【0075】

その結果を図9に示す。すなわち図9はガゴメ昆布由来フコイダンのマウス脾臓リンパ球からの細胞傷害性T細胞の増強作用を示す図であり、縦軸は細胞障害性活性(%)、横軸は対照のエフェクター細胞、及び参考例1記載のガゴメ昆布由来フコイダンを $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加して得られたエフェクター細胞とターゲット細胞との比を示す。棒グラフは各群5匹の平均値と標準誤差を示す。

図9に示すように、LCMVペプチドで免疫したマウスの培養脾細胞は、同じペプチドでラベルしたEL4細胞に対して傷害活性を誘導した(対照)。フコイダンを $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えて培養した細胞では、EL4細胞に対する傷害活性が増強されており、フコイダン添加群では低いエフェクター細胞とターゲット細胞との比にも拘らず、高い細胞傷害活性を示した。

EL4細胞はナチュラルキラー活性には耐性であり、抗原に特異的な細胞傷害性T細胞の活性がフコイダンにより増強された。これは、抗原ペプチドにより免疫されて誘導された細胞傷害性T細胞の前駆細胞が、抗原ペプチドを加えて培養すると成熟し、細胞傷害性を示すようになるが、この時フコイダンが抗原提示細胞を刺激し、IL-12などのサイトカイン産生を介して細胞傷害性T細胞の活性を増強したものと考えられる。

また参考例に記載の他の各フコイダン、その分解物、I画分、II画分、III画分、及び7-12Sも同様の活性を示した。このフコイダンによる細胞傷害

性T細胞の活性増強はリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスだけでなく、他のウイルス感染や悪性腫瘍に対する治療にも応用できる。

【0076】

実施例4

(1) 非刺激リンパ球からのIFN- γ 誘導作用

C57BL/6マウス（雌、6週齢、体重約20g）は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。前記の方法により調製した脾臓リンパ球を播種したプレートの各ウェルに10～500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう参考例3で調製したG-フコイダンを追加し、37℃、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- γ 量をELISAキットを用いて測定した。

その結果、検討した用量においてG-フコイダンによるIFN- γ 誘導作用は認められなかった。

【0077】

(2) 感作リンパ球の抗原刺激下におけるIFN- γ 誘導作用

C57BL/6マウス（雌、6週齢、体重約20g）は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。前記の方法により調製した脾臓リンパ球、及びMeth-Aマウス肉腫細胞を播種したプレートの各ウェルに10～500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう参考例3で調製したG-フコイダンを追加して37℃、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- γ 量、及びIL-12量をELISAキットを用いて測定した。

その結果を図10、図11に示す。すなわち図10はG-フコイダンのIFN- γ 産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸はIFN- γ 産生量(pg/ml)、横軸は試料、及び添加量($\mu\text{g}/\text{ml}$)を示す。また、図11はG-フコイダンのIL-12産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸はIL-12産生量(pg/ml)、横軸は試料、及び添加量($\mu\text{g}/\text{ml}$)を示す。図10、図11に示すように、感作リンパ球の抗原刺激下において、G-フコイダンは10～500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量において用量依存的なIFN- γ 産生の増強作用が認められた。IL-12についても500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量において顕著な産生増強作用が認められた。

【0078】

実施例 5

ガゴメ昆布由来フコイダンのIFN- γ 誘導作用に対する抗IL-12抗体及び抗副刺激レセプター（CD28、CD40）抗体の作用

前記の方法により調製したC57BL/6マウス由来脾臓リンパ球及びMeth-A肉腫細胞を混合して96穴マイクロタイタープレートに播種し、全てのウェルに終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の参考例1-(1)で調製したガゴメ昆布由来フコイダンを添加した。さらに対照以外のウェルに終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗IL-12抗体（R&D社）、又は終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD28、CD40抗体を添加して37℃、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- γ 量、及びIL-12量をELISAにより測定した。その結果を図12に示す。すなわち図12はフコイダンのIFN- γ 誘導作用に対する各種抗体の作用であり、図中左縦軸はIFN- γ 産生量(pg/ml)、右縦軸はIL-12産生量(pg/ml)、横軸は用いた各抗体を示す。

図12に示すように、抗原提示反応時のガゴメ昆布由来フコイダンによるIL-12の産生誘導は抗IL-12抗体、抗CD28抗体、又は抗CD40抗体により完全に抑制された。一方、感作リンパ球からのIFN- γ 産生誘導は抗IL-12抗体により約50%が抑制され、抗CD28抗体、又は抗CD40抗体により完全に抑制された。

【0079】

実施例 6

各種フコイダンのIFN- γ 産生誘導作用の比較

C57BL/6マウスにMeth-Aマウス肉腫細胞を接種して免疫し、接種から24日後に脾臓を摘出した。前記の方法により調製したC57BL/6マウス由来脾臓リンパ球、及びMeth-A肉腫細胞を混合して96穴マイクロタイタープレートに播種した。試料として、参考例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダン、参考例8で調製したオキナワモズク由来フコイダン、参考例5で調製したヒバマタ由来フコイダン、及び参考例4で調製したワカメ・メカブ由来フコイダンを用い、各フコイダンの最終濃度が $10\sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加して37℃、5%炭酸ガス

培養器で4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- γ 量をELISAキットを用いて測定した。

その結果を図13に示す。すなわち図13は各フコイダンのIFN- γ 産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸はIFN- γ 産生量(pg/ml)、横軸は各試料、及び添加量(μ g/ml)を示す。

図13に示すように、感作リンパ球の抗原刺激下におけるIFN- γ 産生誘導能に関して、カゴメ昆布とヒバマタ由来フコイダンは同等、オキナワモズク、ワカメ雌株はそれに比べ弱いIFN- γ 産生誘導作用が認められた。

【0080】

実施例7

1群4または5匹の5週令のウイスター系雄性ラット（日本エスエルシー社）に、卵白アルブミン（シグマ社）の0.01%生理食塩水溶液100 μ l及びアラム（商品名イムジェクト アラム（Imject Alum）；ピアス社製）100 μ lを腹腔内投与して感作し、その14日後に腹大静脈より血液を採取した。

採取した血液は遠心分離（2000rpm, 5分）後、血漿を分離し、ラットを用いた受身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応で抗原特異的IgE量を測定した。すなわち血漿の倍々希釈系列を2倍から64倍まで、生理食塩水を用いて作製し、毛刈りした7週令のウイスター系雄性ラットの背部の皮内に0.1mlずつ注射した。皮内注射の48時間後、0.05%卵白アルブミン及び0.5%エバンスブルー（ナカライテスク社製）の混液1mlを尾静脈より注射した。尾静脈注射30分後、ラットを断頭、放血死させ、背部に現れた青色スポットを観察し、直径5mm以上のスポットを陽性とし、最高希釈倍数をIgE力価として表した。

参考例1-(1)で調製したカゴメ昆布由来フコイダンの投与群は抗原感作日7日前から採血日まで0.1%または1%のカゴメ昆布由来フコイダンを給水瓶に入れ、自由摂取させた。また対照群では水道水を同様に与えた。その結果、卵白アルブミン感作による抗原特異的IgE量の上昇は1%カゴメ昆布由来フコイダンの飲水摂取により著明に抑制された。その結果を表1に示す。

【表 1】

表1

	動物No.	IgE抗体価
対照	1	8
	2	64
	3	16
	4	16
	5	32
ガゴメ昆布由来 フコイダン0.1%	1	8
	2	32
	3	32
	4	32
ガゴメ昆布由来 フコイダン1%	1	<2
	2	<2
	3	<2
	4	4
	5	8

【0081】

実施例 8

実施例 7 と同様の方法により感作したラットに、初回感作から 19 日後に同条件で追加免疫し、最終免疫から 14 日後に腹大静脈より血液を採取した。採取した血液は前記同様 PCA 反応で抗原特異的 IgE 量を測定した。

参考例 1 - (1) で調製したガゴメ昆布由来フコイダンの投与群は追加免疫日から採血日まで 0.1% または 1% のガゴメ昆布由来フコイダンを給水瓶に入れ、自由摂取させた。また対照群では水道水を同様に与えた。その結果、卵白アルブミンによる抗原特異的 IgE 量の上昇は 1% ガゴメ昆布由来フコイダンの飲水摂取により著明に抑制された。このことより、フコイダンは予防的投与に加え、抗原感作時からの治療的投与においても有効であることが示された。その結果を

表 2 に示す。

【表 2】

表 2

	動物No.	1 g E抗体価
対照	1	8
	2	32
	3	32
	4	32
	5	32
ガゴメ昆布由来 フコイダン0.1%	1	16
	2	16
	3	32
	4	32
ガゴメ昆布由来 フコイダン1%	1	2
	2	2
	3	2
	4	4
	5	2

【0082】

実施例 9

(1) 1.5 g 中に、フコイダンとしてガゴメ昆布由来フコイダン 20 mg、ポリフェノールとして市販のリンゴ抽出物（商品名：アップルフェノン）、ブドウ種子抽出物（商品名：グラヴィノール）、甜茶抽出物（サンテンチャ S）の合計 82 mg、残余がビーフエキス、ビール酵母、乳糖、コーンスターチ、還元麦芽糖となるように原料を配合し、本発明の飼料添加物（1 mm 径）を押し出し造粒機を用い製造し、一包 1.5 g とした。

(2) 大型犬の場合は 1 日 3 包、小型犬には一日 1 包各々の飼料に上記飼料添加剤を栄養補助食として添加した。

本発明の飼料添加剤の摂取により、大型犬、小型犬共に活動が活発となり、食欲も増進した。また体調の改善効果により、毛並みが改善され、体臭、糞尿の臭いは軽減した。これらの効果は特に老犬において顕著に見られ、老犬の体調改善、健康回復、若返りに本発明の飼料は極めて有用であった。

【 0 0 8 3 】

【発明の効果】

本発明によりサイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、及び抗アレルギー作用を示す物質を有効成分として含有するサイトカイン産生調節を要する疾患、免疫賦活を要する疾患、一酸化窒素産生誘導を要する疾患及びアレルギー疾患に有効な医薬が提供される。該医薬は、生体内におけるインターロイキン類、インターフェロン類等の産生調節活性を有し、がん、免疫性疾患等のサイトカインの産生調節を必要とする疾患の治療剤又は予防剤として有用である。

また特に I F N - γ 産生誘導剤、I L - 2 産生誘導剤、細胞障害性 T 細胞増強剤、N O 産生誘導剤としてこれらの薬剤の適用を要する疾患の治療剤として有用である。

不必要な状態での免疫系の活性化あるいは増強は、アレルギー、自己免疫疾患等の疾病を惹起する場合があるが、本発明の製剤によるサイトカイン増強、免疫増強は選択的なものであり、ウイルス感染、あるいはがん等、体内に排除すべき抗原が存在し、細胞性免疫の増強が必要なときのみ起こることにより、本発明の製剤は生体防御に極めて有用である。

また本発明の製剤により過剰な体液性免疫の活性化が抑制され、本発明の製剤はアレルギーの抑制にも極めて有用である。

【 0 0 8 4 】

更に、サイトカイン産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用及び抗アレルギー作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を用いて飲食品又は飼料を製造することが可能になり、日常の飲食品として摂取することにより、サイトカインの産生調節を要する疾患、免疫賦活を要する疾患、一酸化窒素産生誘導を要する疾患、例えば動脈硬化症、アレルギー疾患等の症状改善等が可能と

なる。

従って、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分とする機能性飲食品又は飼料は、これらの生理作用により、生体の恒常性の維持に有用な機能性飲食品又は飼料である。

またサイトカインの産生調節剤も提供され、当該誘導剤はサイトカインの機能研究、サイトカインが関連する疾病用医薬のスクリーニングに有用である。

【 0 0 8 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Pharmaceutical agents

<130> T-1495

<160> 2

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Lymphocytic choriomeningitis virus

<400> 1

Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Met

1

5

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 2

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ガゴメ昆布由来フコイダンのDEAE-セルロフエインA-800カラム溶出パターンを示す図である。

【図 2】

7-12Sを添加して培養した時の培地中の NO_2^- 濃度を示す図である。

【図 3】

I画分を添加して培養した時の培地中の NO_2^- 濃度を示す図である。

【図 4】

II画分を添加して培養した時の培地中の NO_2^- 濃度を示す図である。

【図 5】

III画分を添加して培養した時の培地中の NO_2^- 濃度を示す図である。

【図 6】

対照のLPSを添加して培養した時の培地中の NO_2^- 濃度を示す図である。

【図 7】

フコイダン及びその分解物のIFN- γ 産生誘導作用を示す図である。

【図 8】

フコイダン及びその分解物IL-12産生誘導作用を示す図である。

【図 9】

ガゴメ昆布由来フコイダンのマウス脾臓リンパ球からの細胞傷害性T細胞の増強作用を示す図である。

【図 10】

G-フコイダンのIFN- γ 産生誘導作用を示す図である。

【図 1 1】

G-フコイダンの I L - 1 2 産生誘導作用を示す図である。

【図 1 2】

フコイダンの I F N - γ 誘導作用に対する各種抗体の作用を示す図である。

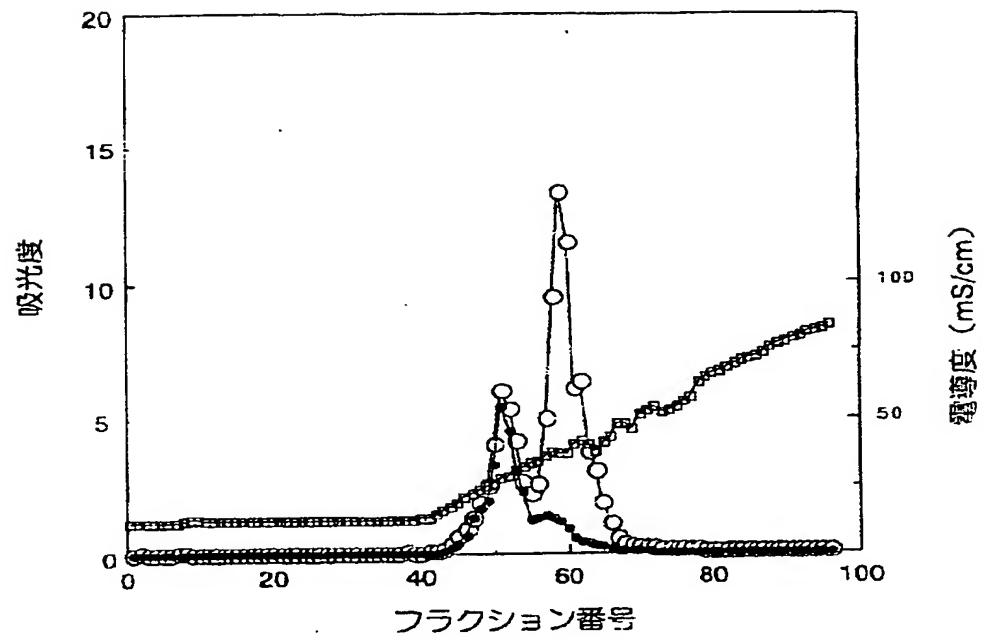
【図 1 3】

各フコイダンの I F N - γ 産生誘導作用を示す図である。

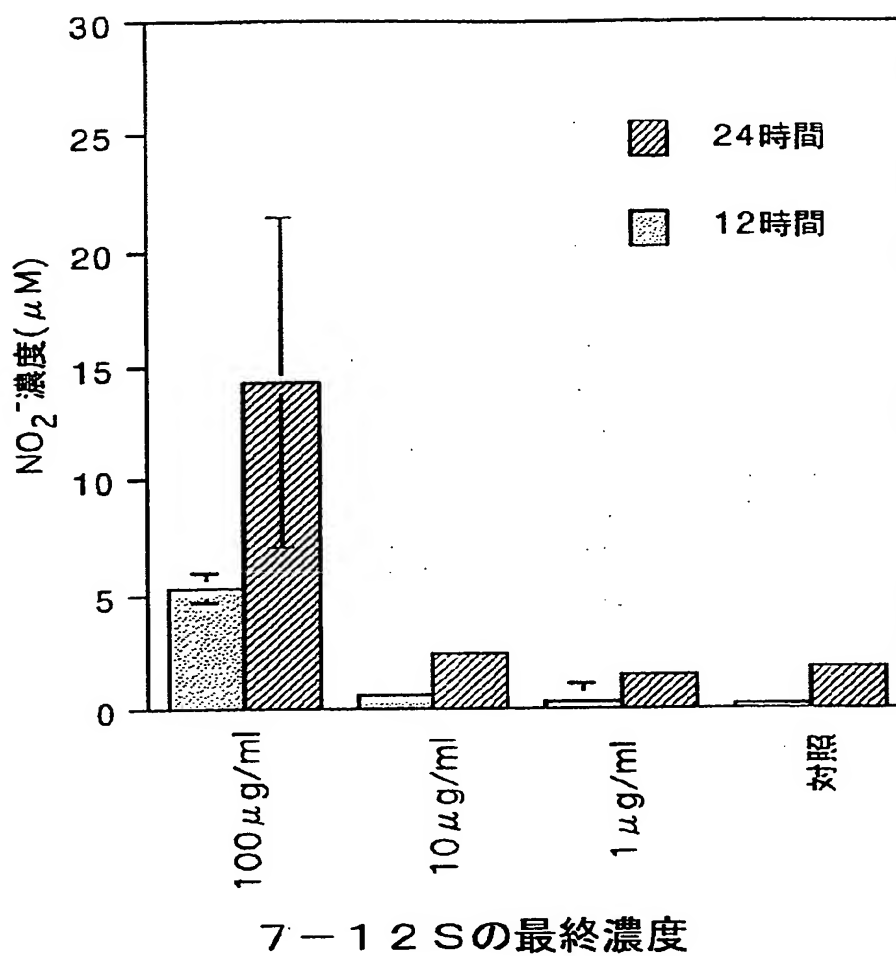
【書類名】

図面

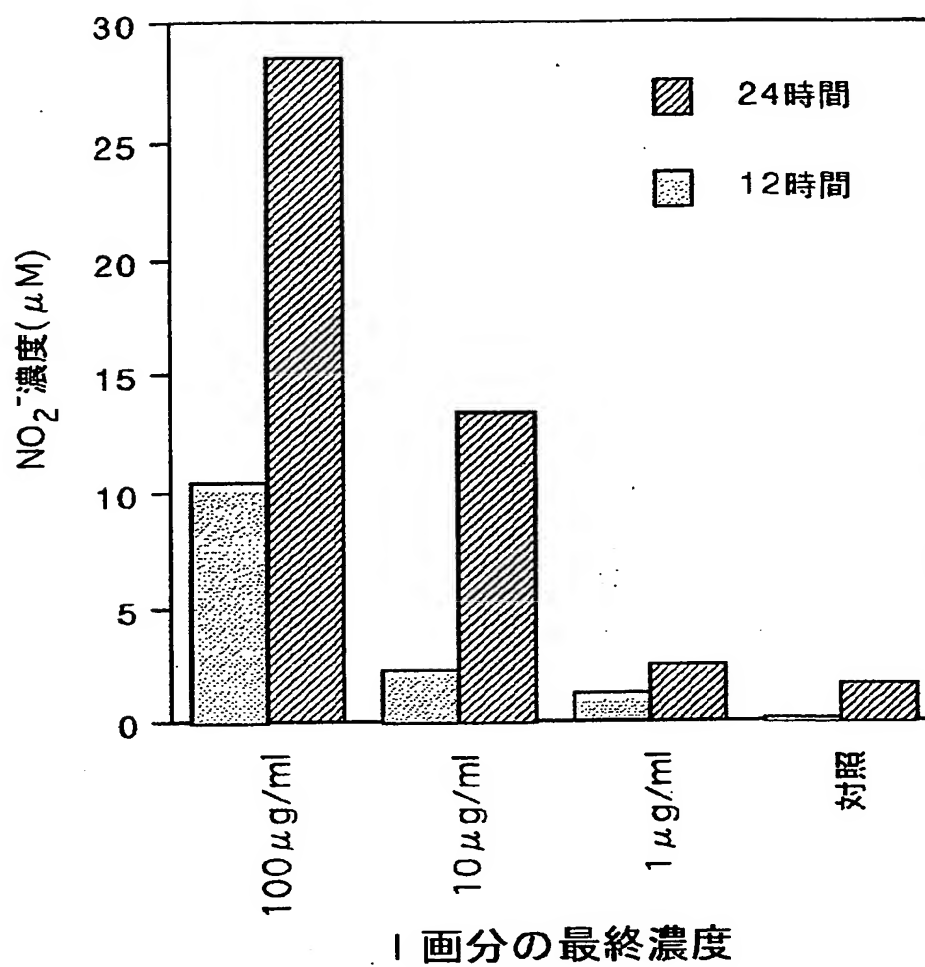
【図 1】



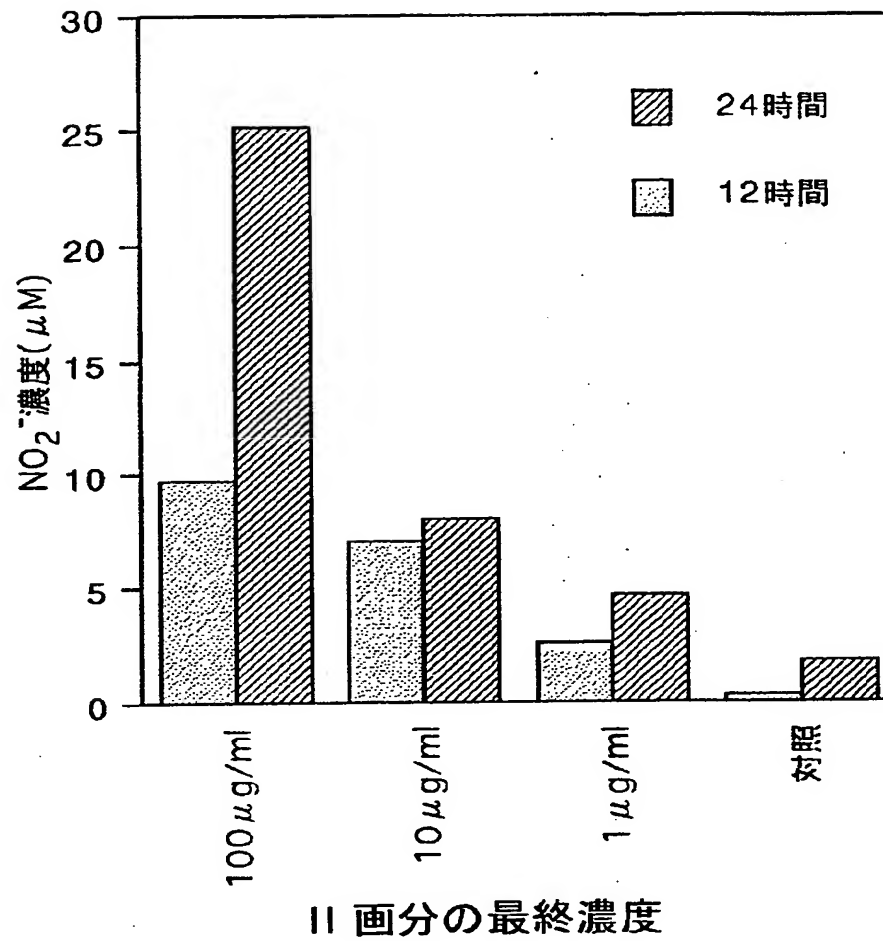
【図 2】



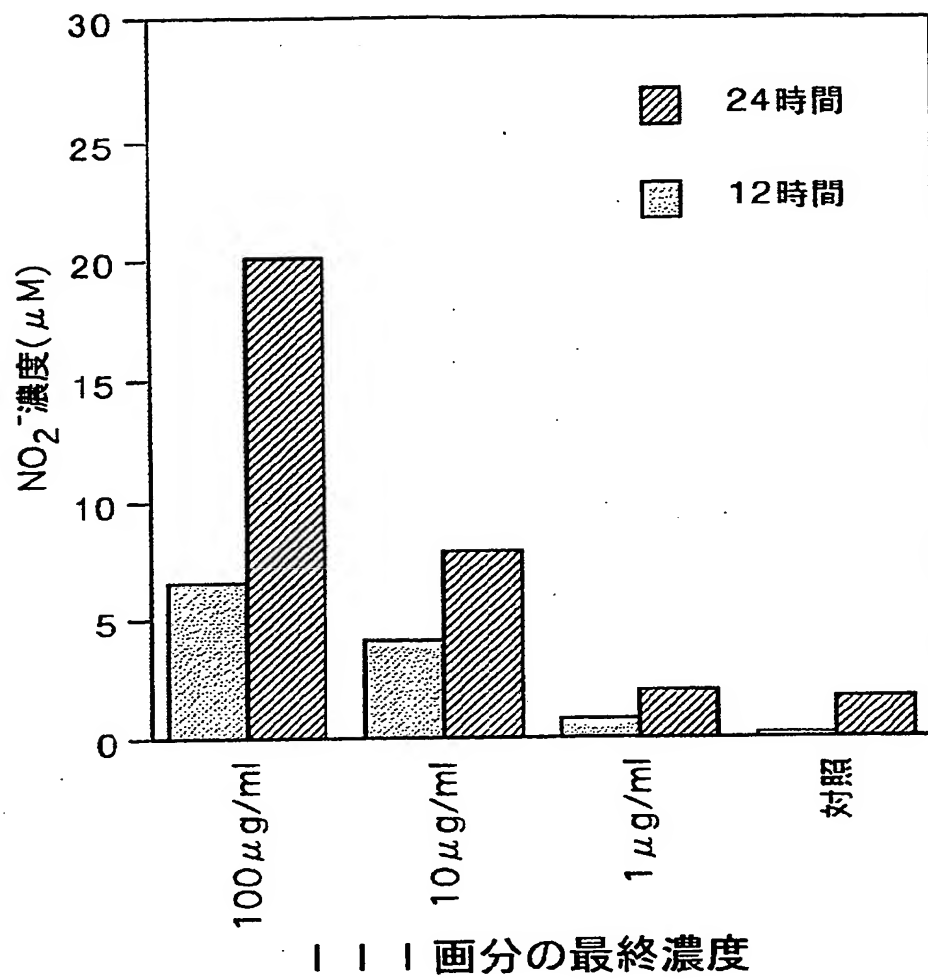
【図 3】



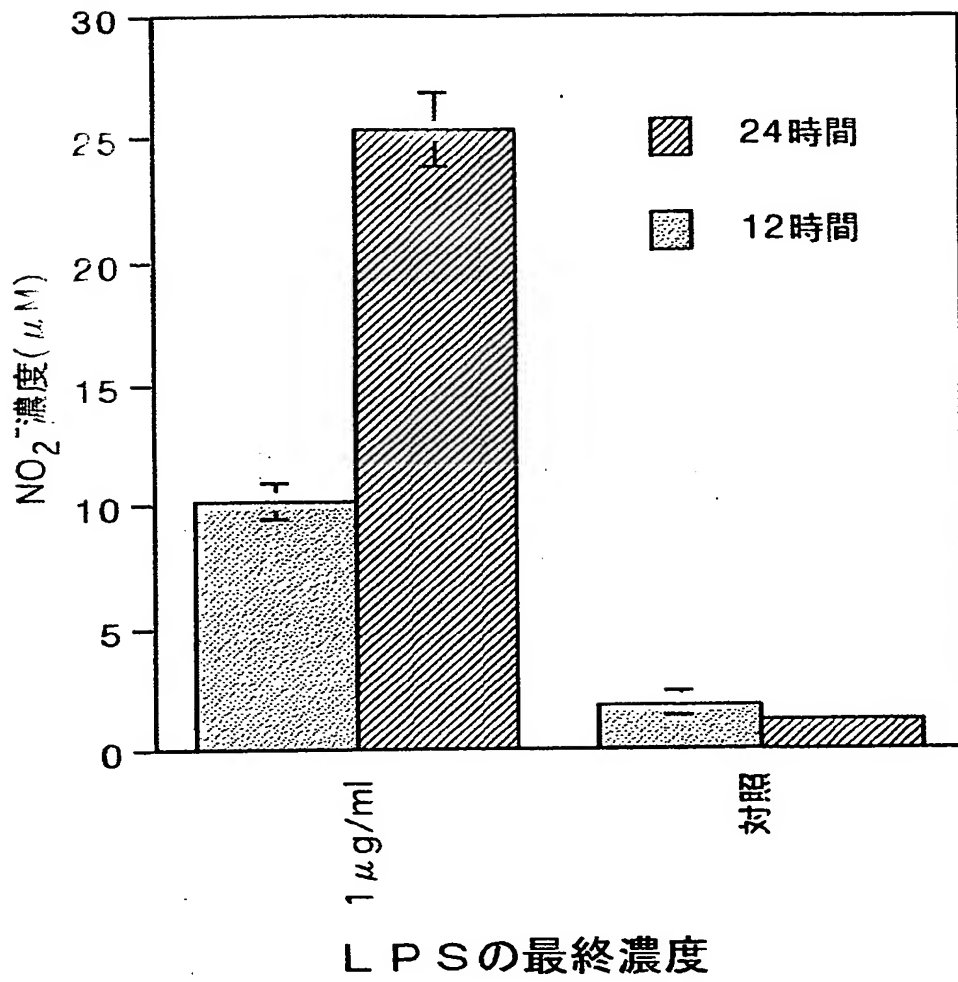
【図 4】



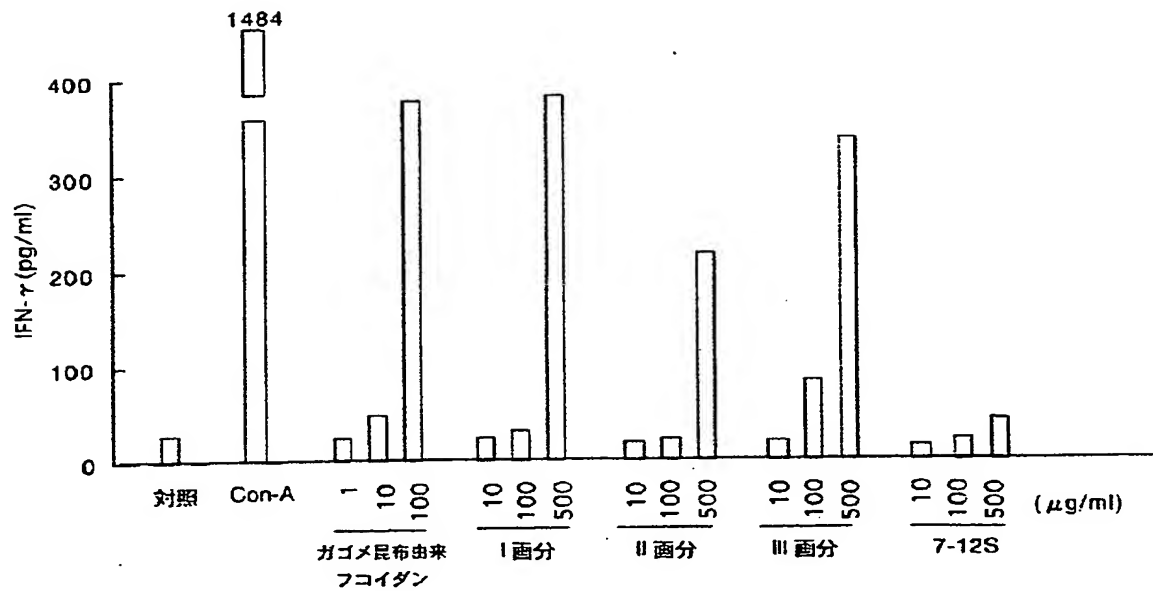
【図 5】



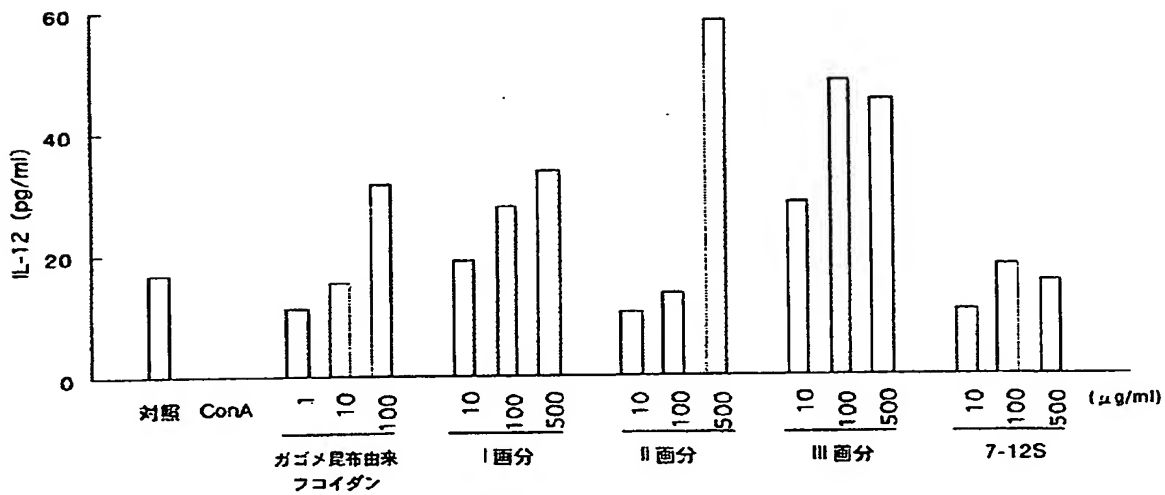
【図 6】



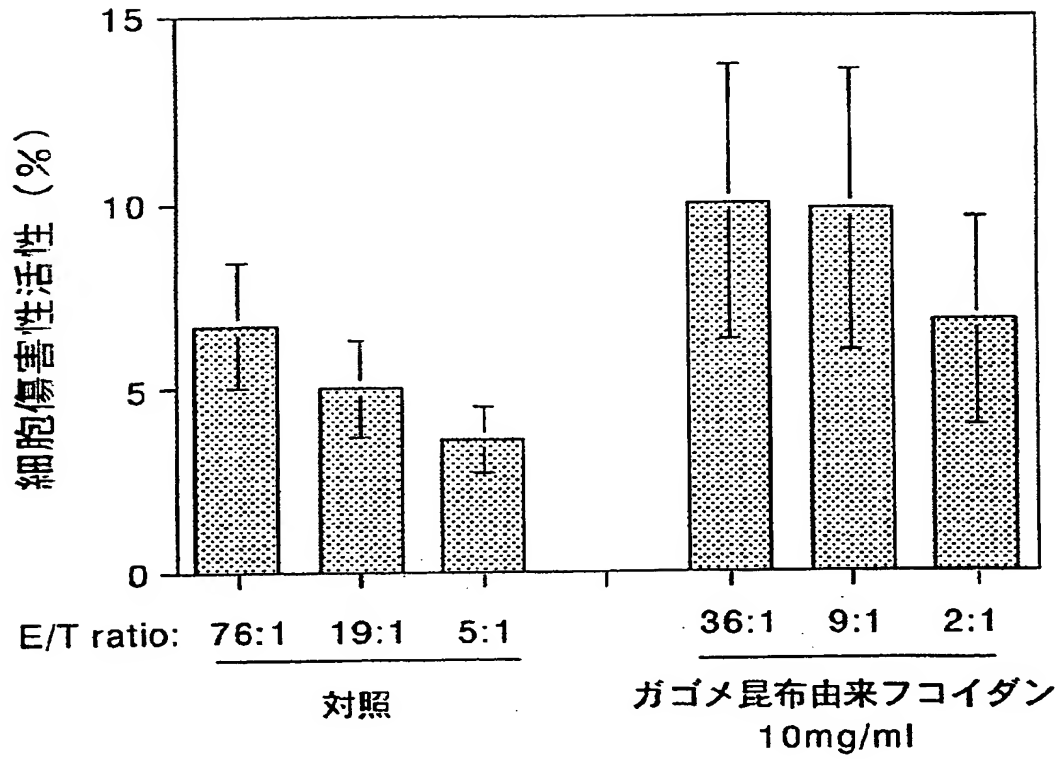
【図 7】



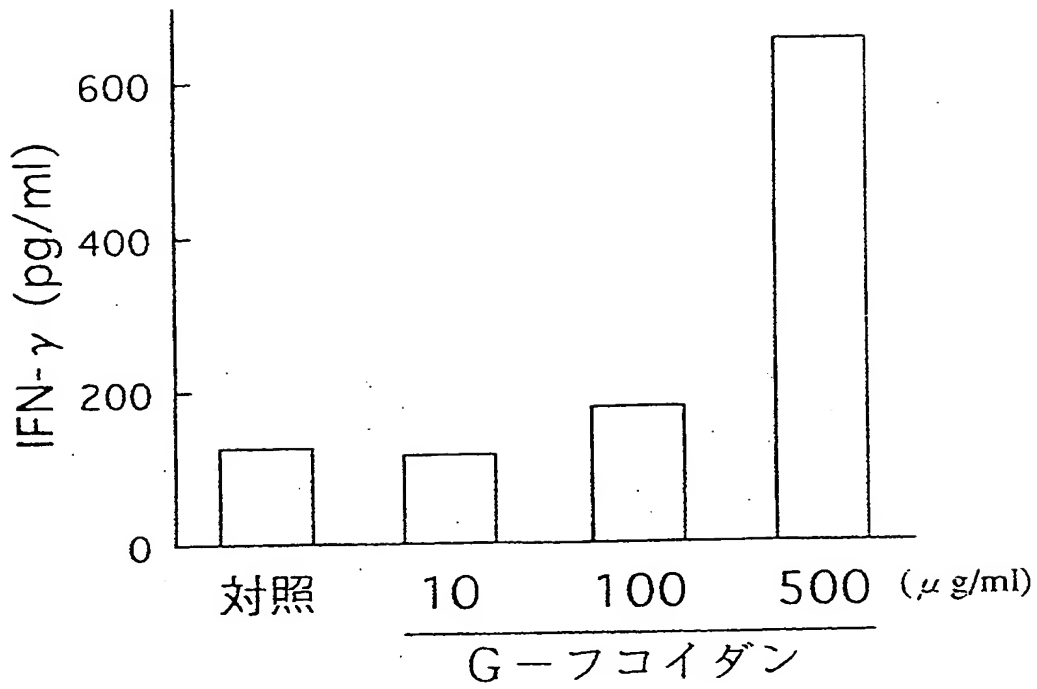
【図 8】



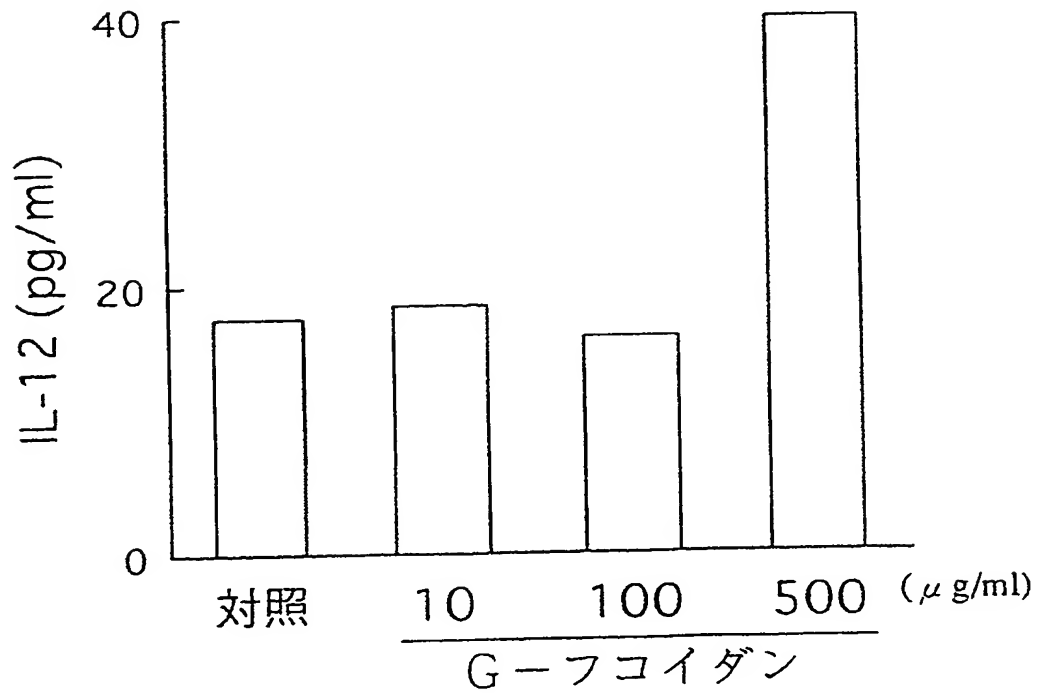
【図9】



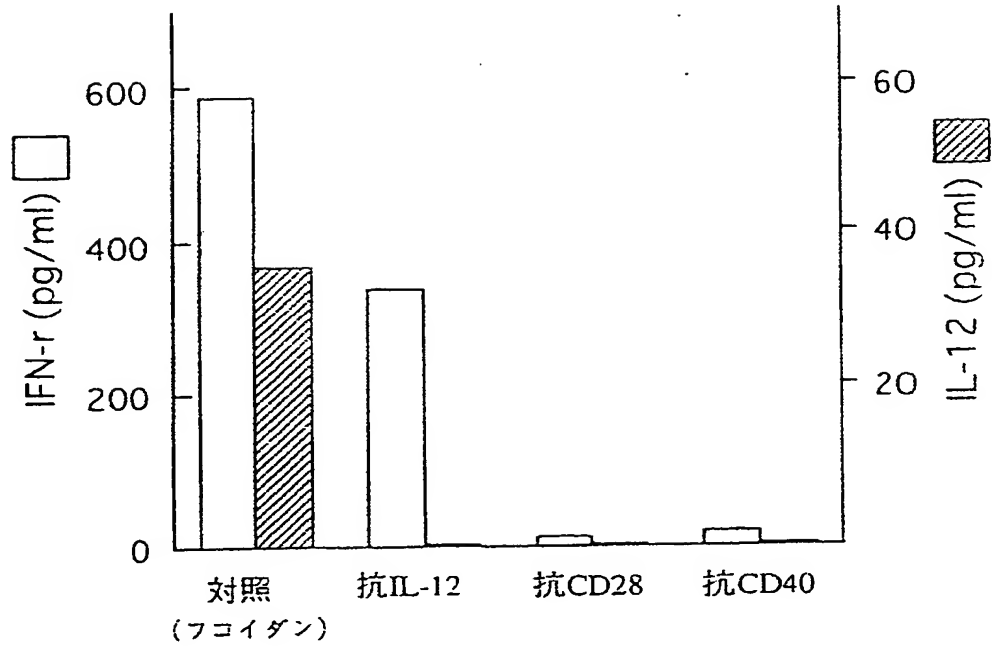
【図10】



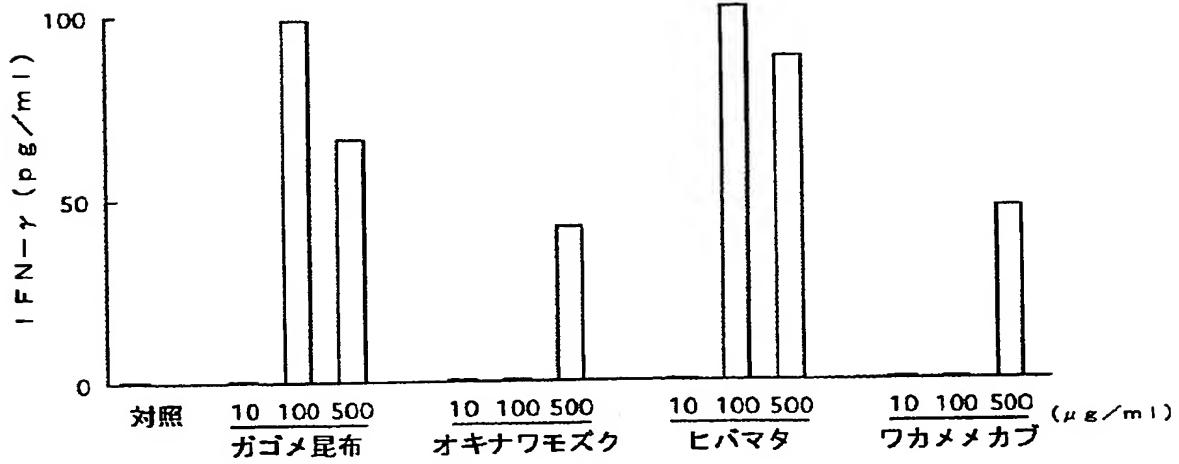
【図11】



【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

フコイダンのサイトカイン産生調節作用等を利用した医薬、食品、飲料又飼料はを提供すること。

【解決手段】

フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン産生調節を要する疾患、免疫賦活を要する疾患、又は一酸化窒素産生を要する疾患の治療剤又は予防剤、もしくはフコイダン又はその分解物を含有、添加及び／又は希釈してなるサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、免疫賦活用食品、飲料又は飼料又は一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料。

【選択図】 なし

特 2000-069223

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社